



EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

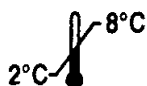
 96

REF 071064

 192

REF 071068

 480



IVD

CE 0459

This package insert must be read carefully before product use.

Package insert instructions must be carefully followed.

Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package.



Manufacturer:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

www.adaltis.net

en

SYMBOLS USED ON LABELS

English EN							
	In Vitro Diagnostic Medical Device	Catalogue Number	Lot Number	Attention, See Instructions For Use	Temperature Limitation	Use By	Number of Test
				MICROPLATE	CONTROL+	CONTROL-	CAL
	Manufacturer	Keep away from Sunlight	Date of Manufacture	Microplate	Positive Control	Negative Control	Calibrator
	CONJ	DILSPE	SUBSTMB	SOLNSTOP	WASHBUF20X	DILAS	RCNSx mL
	Conjugate	Sample Diluent	Substrate TMB	Stop Solution (H ₂ SO ₄ 0,3 M)	Wash Buffer Conc. (20x)	Assay Diluent	Reconstitute with x mL
	Biological Risk	Danger	Warning				

Attention:

Stop Solution classified as: Skin Corr. 1A



- Signal word:**
Danger
- Hazard-determining components of labelling:**
Sulphuric acid
- Hazard statements:**
H314 Causes severe skin burns and eye damage.
- Precautionary statements:**
P260 Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.
P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P310 Immediately call a POISON CENTER/doctor.
P405 Store locked up.
P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Attention:

Negative Control, Positive Control, Calibrator, Conjugate, Sample Diluent, Assay Diluent and Wash Buffer Concentrate 20X classified as: Skin Sens. 1



- Signal word:**
Warning
- Hazard-determining components of labelling:**
Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- Hazard statements:**
H317 May cause an allergic skin reaction.
- Precautionary statements:**
P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P321 Specific treatment (see on this label).
P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Refer to www.adaltis.net for the Safety Data Sheets.

A. INTENDED USE

Fourth generation Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of antibodies to Hepatitis C Virus in human plasma (EDTA, Heparin and Citrate) and sera. The kit may be used for the screening of blood units of HCV-infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) define Hepatitis C infection as follows:

"Hepatitis C is a viral infection of the liver which had been referred to as parenterally transmitted "non A, non B hepatitis" until identification of the causative agent in 1989. The discovery and characterization of the hepatitis C virus (HCV) led to the understanding of its primary role in post transfusion hepatitis and its tendency to induce persistent infection.

HCV is a major cause of acute hepatitis and chronic liver disease, including cirrhosis and liver cancer. Globally, an estimated 170 million persons are chronically infected with HCV and 3 to 4 million persons are newly infected each year. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. The major causes of HCV infection worldwide are use of unscreened blood transfusions, and re-use of needles and syringes that have not been adequately sterilized. No vaccine is currently available to prevent hepatitis C and treatment for chronic hepatitis C is too costly for most persons in developing countries to afford. Thus, from a global perspective, the greatest impact on hepatitis C disease burden will likely be achieved by focusing efforts on reducing the risk of HCV transmission from nosocomial exposures (e.g. blood transfusions, unsafe injection practices) and high-risk behaviours (e.g. injection drug use).

Hepatitis C virus (HCV) is one of the viruses (A, B, C, D, and E), which together account for the vast majority of cases of viral hepatitis. It is an enveloped RNA virus in the flaviviridae family which appears to have a narrow host range. Humans and chimpanzees are the only known species susceptible to infection, with both species developing similar disease. An important feature of the virus is the relative mutability of its genome, which in turn is probably related to the high propensity (80%) of inducing chronic infection. HCV is clustered into several distinct genotypes which may be important in determining the severity of the disease and the response to treatment.

The incubation period of HCV infection before the onset of clinical symptoms ranges from 15 to 150 days. In acute infections, the most common symptoms are fatigue and jaundice; however, the majority of cases (between 60% and 70%), even those that develop chronic infection, are asymptomatic. About 80% of newly infected patients progress to develop chronic infection. Cirrhosis develops in about 10% to 20% of persons with chronic infection, and liver cancer develops in 1% to 5% of persons with chronic infection over a period of 20 to 30 years. Most patients suffering from liver cancer who do

not have hepatitis B virus infection have evidence of HCV infection. The mechanisms by which HCV infection leads to liver cancer are still unclear. Hepatitis C also exacerbates the severity of underlying liver disease when it coexists with other hepatic conditions. In particular, liver disease progresses more rapidly among persons with alcoholic liver disease and HCV infection. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. Transmission through blood transfusions that are not screened for HCV infection, through the reuse of inadequately sterilized needles, syringes or other medical equipment, or through needle-sharing among drug-users, is well documented. Sexual and perinatal transmission may also occur, although less frequently. Other modes of transmission such as social, cultural, and behavioural practices using percutaneous procedures (e.g. ear and body piercing, circumcision, tattooing) can occur if inadequately sterilized equipment is used. HCV is not spread by sneezing, hugging, coughing, food or water, sharing eating utensils, or casual contact.

In both developed and developing countries, high risk groups include injecting drug users, recipients of unscreened blood, haemophiliacs, dialysis patients and persons with multiple sex partners who engage in unprotected sex. In developed countries, it is estimated that 90% of persons with chronic HCV infection are current and former injecting drug users and those with a history of transfusion of unscreened blood or blood products. In many developing countries, where unscreened blood and blood products are still being used, the major means of transmission are unsterilized injection equipment and unscreened blood transfusions. In addition, people who use traditional scarification and circumcision practices are at risk if they use or re-use unsterilized tools.

WHO estimates that about 170 million people, 3% of the world's population, are infected with HCV and are at risk of developing liver cirrhosis and/or liver cancer. The prevalence of HCV infection in some countries in Africa, the Eastern Mediterranean, South-East Asia and the Western Pacific (when prevalence data are available) is high compared to some countries in North America and Europe.

Diagnostic tests for HCV are used to prevent infection through screening of donor blood and plasma, to establish the clinical diagnosis and to make better decisions regarding medical management of a patient. Diagnostic tests commercially available today are based on Enzyme immunoassay (EIA) for the detection of HCV specific antibodies. EIAs can detect more than 95% of chronically infected patients but can detect only 50% to 70% of acute infections. A recombinant immunoblot assay (RIBA) that identifies antibodies which react with individual HCV antigens is often used as a supplemental test for confirmation of a positive EIA result. Testing for HCV circulating by amplification tests RNA (e.g. polymerase chain reaction or PCR, branched DNA assay) is also being utilized for confirmation of serological results as well as for assessing the effectiveness of antiviral therapy. A positive result indicates the presence of active infection and a potential for spread of the infection and/or the development of chronic liver disease.

Antiviral drugs such as interferon taken alone or in combination with ribavirin, can be used for the treatment of persons with chronic hepatitis C, but the cost of treatment is very high. Treatment with interferon alone is effective in about 10% to 20% of patients. Interferon combined with ribavirin is effective in about 30% to 50% of patients. Ribavirin does not appear to be effective when used alone.

There is no vaccine against HCV. Research is in progress but the high mutability of the HCV genome complicates vaccine development. Lack of knowledge of any protective immune response following HCV infection also impedes vaccine research. It is not known whether the immune system is able to eliminate the virus.

Some studies, however, have shown the presence of virus neutralizing antibodies in patients with HCV infection. In the absence of a vaccine, all precautions to prevent infection must be taken including (a) screening and testing of blood and organ donors; (b) Virus inactivation of plasma derived products; (c) implementation and maintenance of infection control practices in health care settings, including appropriate sterilization of medical and dental equipment; (d) promotion of behaviour change among the general public and health care workers to reduce overuse of injections and to use safe injection practices; and (e) Risk reduction counselling for persons with high-risk drug and sexual practices. “

The genome encodes for structural components, a nucleocapsid protein and two envelope glycoproteins, and functional constituents involved in the virus replication and protein processing. The nucleocapsid-encoding region seems to be the most conservative among the isolates obtained all over the world.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with HCV-specific antigens derived from “core” and “ns” regions encoding for conservative and immunodominant antigenic determinants (Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides).

The solid phase is first treated with the diluted sample and HCV Ab are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound HCV antibodies, IgG and IgM as well, are detected by the addition of polyclonal specific anti hlgG&M antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate TMB mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti HCV antibodies present in the sample. A cut-off value let optical densities be interpreted into HCV antibody negative and positive results.

D. COMPONENTS

The kit contains reagents for 96 tests (code 071067), 192 tests (code 071064), or 480 tests (code 071068).

Microplate	1
Negative Control	1x4 mL/vial
Positive Control	1x2 mL/vial
Calibrator	2 vials
Wash Buffer Concentrate 20x	1x50 mL/vial
Conjugate	1x16 mL/vial
Sample Diluent	1x50 mL/vial
Substrate TMB	1x16 mL/vial
Stop Solution	1x15 mL/vial
Assay Diluent	1x8 mL/vial
Plate sealing foils	2
Number of tests	96
Code	071067

Microplate	2
Negative Control	2x4 mL/vial
Positive Control	1x4 mL/vial
Calibrator	3 vials
Wash Buffer Concentrate 20x	2x50 mL/vials
Conjugate	2x16 mL/vials
Sample Diluent	2x50 mL/vials
Substrate TMB	2x16 mL/vials
Stop Solution	2x15 mL/vial
Assay Diluent	2x8 mL/vial
Plate sealing foils	4
Number of tests	192
Code	071064

Microplate	5
Negative Control	1x20 mL/vial
Positive Control	1x10 mL/vial
Calibrator	7 vials
Wash Buffer Concentrate 20x	5x50 mL/vials
Conjugate	2x40 mL/vial
Sample Diluent	5x50 mL/vials
Substrate TMB	2x40 mL/vials
Stop Solution	2x40 mL/vial
Assay Diluent	1x40 mL/vial
Plate sealing foils	10
Number of tests	480
Code	071068

1. Microplate

12 strips of 8 microwells coated with Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides. Plates are sealed into a aluminium pouch with desiccant. Bring the microplate to room temperature (18...24°C) before opening the bag. Unused strips have to be returned into the pouch and the pouch has to be sealed and stored back to 2...8°C, in presence of the desiccant.

2. Negative Control

Ready to use control. It contains 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 2% casein as protein base and 0.1% Proclin 150 as preservative. The negative control is olive green colour coded.

3. Positive Control

Ready to use control. It contains 1% goat serum proteins, human antibodies positive to HCV, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.1% Proclin 150 as preservatives. The Positive Control is dark green colour coded.

Important Note: The absence of viable pathogens in the Positive Control can not be fully ensured, and therefore,

the reagent should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.

4. Calibrator

Lyophilized calibrator. To be dissolved with the volume of EIA grade water reported on the label. It contains foetal bovine serum proteins, human antibodies to HCV whose content is calibrated on the NIBSC Working Standard code 06/188-006, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1 , 0.3 mg/mL gentamicin sulfate and 0.1% Proclin 150 as preservatives.

Important Note: *The absence of viable pathogens in the Calibrator can not be fully ensured, and therefore, the reagent should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.*

Note: *The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.*

5. Wash Buffer Concentrate 20x

20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution (wash buffer diluted) contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0 ± 0.2 , 0.05% Tween 20 and 0.05% Proclin 150.

Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at $2...8^{\circ}\text{C}$.

6. Conjugate

Ready to use and red colour coded reagent. It contains Horseradish Peroxidase conjugated goat polyclonal antibodies to human IgG and IgM, 5% BSA, 10 mM Citrate buffer pH 6.4 ± 0.1 , 0.1% Proclin and 0.05% Tween 20 as preservatives.

7. Substrate TMB

Ready-to-use component. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H_2O_2 . Mix gently before use.

Note: *To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.*

8. Assay diluent

Ready-to-use component. It contains goat serum, 10 mM tris buffered solution pH 8.0 ± 0.1 containing 0.1% Proclin 150 and 0.09% Na azide for the pre-treatment of samples and controls in the plate, blocking interference.

9. Stop Solution

Ready-to-use component.

It contains 0.3 M H_2SO_4 solution. Mix gently before use.

10. Sample Diluent

Ready-to-use component and dark green colour coded. It contains 1% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1 and 0.1% Proclin 150 as preservative.

To be used to dilute the sample.

Note: *The diluent changes colour from olive green to dark bluish green in the presence of sample.*

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (200 μL and 10 μL) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of $+37^{\circ}\text{C}$.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and possibly with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
This package insert must be read carefully before product use.
2. Read carefully the Safety Data Sheet (SDS) before product use.
3. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
4. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
6. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Substrate (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
7. Upon receipt, store the kit at $2...8^{\circ}\text{C}$ into a temperature controlled refrigerator or cold room.
8. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
9. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
10. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample.
11. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one.

12. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
13. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
15. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min.
16. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
17. The Stop Solution contains 0.3M sulphuric acid. Avoid contact with skin and eyes. In the event of contact, rinse immediately with plenty of water.
18. Dispose of reagent solutions containing sodium azide as preservatives according to all local, state and national regulations. To dispose of reagents containing azide, flush away using copious amounts of water. Dispose with caution as sodium azide can form explosive compounds on prolonged contact with lead or copper piping.
19. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas in which specimens or kit reagents are handled
20. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.
21. Do not pipette by mouth.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECCOMANDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2...8°C for up to five days after collection. For longer storage periods, samples can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 1 re-use of the device and up to 6 months.

1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the pouch. Check that the desiccant has not turned to dark green, indicating a defect in manufacturing. In this case, call Adaltis's customer service.

Unused strips have to be placed back inside the aluminium pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2...8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Handle this component as potentially infectious.

4. Calibrator:

Dissolve carefully the content of the lyophilised vial with the volume of EIA grade water reported on its label. Mix well on vortex before use.

Handle this component as potentially infectious.

Note: When dissolved the Calibrator is not stable. Store in aliquots at -20°C.

5. Wash Buffer Concentrate 20x (vial of 50 mL):

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1000 mL (the volume is reported on the label) and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2...8°C.

6. Conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. If this component

has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

7. Substrate TMB:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces. If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

8. Assay Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

9. Stop Solution:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

10. Sample Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at $+37^{\circ}\text{C}$ (tolerance of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The ELISA washer is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated and correctly optimized. Usually 4-5 washing cycles (aspiration + dispensation of $350\text{ }\mu\text{L}$ /well of washing solution = 1 cycle) are sufficient to ensure that the assay performs as expected. A soaking time of 20-30 seconds between cycles is suggested. In order to set correctly their number, it is recommended to run an assay with the kit controls/calibrator and well-characterized negative and positive reference samples, and check to match the values reported below in sections O "Internal Quality Control". Regular calibration of the volumes delivered and maintenance (decontamination and cleaning of needles) of the washer has to be carried out according to the instructions of the manufacturer.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
 - ✓ Short Incubation Method (for 1st / 2nd incubation tolerance between 43 min to 47 min; for 3rd incubation tolerance between 14 and 16 min).
 - ✓ Standard Incubation Method (for 1st incubation tolerance between 57 min to 63 min; for 2nd and 3rd incubation tolerance between 29 and 31 min).
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and ideally with a second

filter (620-630nm) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth $\leq 10\text{ nm}$; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in sections O "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Substrate TMB is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Buffer as described above.
4. Dissolve the Calibrator as described above.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.
6. Set the ELISA incubator at $+37^{\circ}\text{C}$ and prepare the ELISA washer by priming with the diluted wash solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as found in section I.3.
7. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
9. Check that the micropipettes are set to the required volume.
10. Check that all the other equipment is available and ready to use.
11. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

The Assay Procedure can be done with two times incubation procedures. Choose the one that is required by your regulation:

1. Standard Incubation (1st incubation 60 minutes, 2nd and 3rd incubation 30 minutes)
2. Short Incubation (1st and 2nd incubation 45 minutes, 3rd incubation 15 minutes)

1. Standard Incubation - Manual assay:

1. Place the required number of microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
2. Dispense 200 µL of Negative Control in triplicate, 200 µL Calibrator in duplicate and 200 µL Positive Control in single in proper wells. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use!
3. Add 200 µL of Sample Diluent to all the sample wells; then dispense 10 µL sample in each properly identified well. Mix gently the plate, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into its diluent.

Important note: Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Dispense 50 µL Assay Diluent into all the controls/calibrator and sample wells. Check that the color of samples has turned to dark blue.
5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.
6. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350 µL/well of diluted wash solution as reported in section I.3.
7. Pipette 100 µL Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **30 min at +37°C**.
9. Wash microwells as reported in section I.3.
10. Pipette 100 µL Substrate TMB mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at room temperature (18...24°C) for **30 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100 µL Stop Solution into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of stop solution will

turn the positive control and positive samples from blue to yellow.

12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

Important notes:

1. If the second filter is not available, ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the substrate can occur leading to a higher background.
3. Shaking at 350 ±150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.

2. Short Incubation - Manual assay:

1. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
2. Dispense 200 µL of Negative Control in triplicate, 200 µL Calibrator in duplicate and 200 µL Positive Control in single in proper wells. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use!
3. Add 200 µL of Sample Diluent to all the sample wells; then dispense 10 µL sample in each properly identified well. Mix gently the plate, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into its diluent.

Important note: Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Dispense 50 µL Assay Diluent into all the controls/calibrator and sample wells. Check that the color of samples has turned to dark blue.
5. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.
6. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350 µL/well of diluted washing solution as reported in section I.3.
7. Pipette 100 µL Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
9. Wash microwells as reported in section I.3.
10. Pipette 100 µL Substrate TMB mixture into each well, the blank well included. Then incubate the

microplate at room temperature (18...24°C) for **15 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µL Stop Solution into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of stop solution will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

Important notes:

- If the second filter is not available, ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the substrate can occur leading to a higher background.
- Shaking at 350 ±150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations (Standard Incubation)	Operations (Short Incubation)
Controls & Calibrator	200 µL	200 µL
Sample Diluent & Sample	200 µL diluent.+ 10 µL sample	200 µL diluent.+ 10 µL sample
Assay Diluent	50 µL	50 µL
1st incubation	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperature	+37°C	+37°C
Wash step	4-5 cycles	4-5 cycles
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL
2nd incubation	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperature	+37°C	+37°C
Wash step	4-5 cycles	4-5 cycles
Substrate TMB	100 µL	100 µL
3rd incubation	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperature	Room temperature (18...24°C)	Room temperature (18...24°C)
Stop Solution	100 µL	100 µL
Reading OD	450/620nm	450/620nm

An example of dispensation scheme is reported below (valid for both incubation time procedures):

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
CAL = Calibrator PC = Positive Control S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether their OD450/620nm values are as expected and reported in the table below.

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD 450/620nm value
Negative Control (NC)	< 0.050 mean OD450/620nm after blanking
Calibrator	S/Co >1.1
Positive Control	>1.000 OD450/620nm value

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problems	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.050 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to spills of positive samples or of the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Calibrator S/Co<1.1	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of calibrator) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control <1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value > 0.150,too. 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

P. RESULTS

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC mean} + 0.350$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as ratio of the sample OD450nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 - 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient has not been infected by HCV or that the blood unit may be transfused. Any patient showing an equivocal result should be tested again on a second sample taken 1-2 weeks later from the patient and examined. The blood unit should not be transfused.

A positive result is indicative of HCV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the responsible of the laboratory to reduce the risk of judgement errors and misinterpretations.
2. Any positive result should be confirmed by an alternative method capable to detect IgG and IgM antibodies (confirmation test) before a diagnosis of viral hepatitis is formulated.
3. As proved in the Performance Evaluation of the product, the assay is able to detect seroconversion to anti HCV core antibodies **earlier** than some other commercial kits. Therefore a positive result, not confirmed with these commercial kits, does not have to be ruled out as a false positive result ! The sample has to be anyway submitted to a confirmation test.
4. As long as the assay is able to detect also IgM antibodies some discrepant results with other commercial products for the detection of anti HCV antibodies - lacking anti hIgM conjugate in the formulation of the enzyme tracer and therefore missing IgM reactivity - may be present. The real positivity of the sample for antibodies to HCV should be then confirmed by examining also IgM reactivity, important for the diagnosis of HCV infection.
5. When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.
6. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be done and released to the patient only by a qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below:

The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Mean Value: 0.020 OD450nm Lower than 0.050 – Accepted

Positive Control: 2.189 OD450nm

Higher than 1.000 – Accepted

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370

Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm

Mean value: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S/Co higher than 1.1 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm

Sample 2: 1.690 OD450nm

Sample 1 S/Co < 0.9 = negative

Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

R. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC) and with both incubation procedures (standard and short).

1. LIMIT OF DETECTION

The limit of detection of the assay has been calculated using the short incubation assay by means of the British Working Standard for anti-HCV, NIBSC code 06/188-006. The table below reports the mean OD450nm values of this standard when diluted in negative plasma and then examined.

Dilution	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Negative Plasma	0,25	0,20	0,20

In addition the sample coded Accurun 1 - series 3000 - supplied by Boston Biomedica Inc., USA, has been evaluated "in toto" showing the results below:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

The Performance Evaluation of the device was carried out in a trial conducted on more than total 5000 samples.

2.1 Diagnostic specificity

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte. A total of more 5000 unselected donors, including 1st time donors, were examined.

The diagnostic specificity was assessed against a kit US FDA approved.

5043 blood donors were tested providing a specificity of 99.5%. 210 hospitalized patients were tested for HCV Ab; a diagnostic specificity of 99.5% was found.

Moreover, diagnostic specificity was assessed by testing 162 potentially interfering specimens (other infectious diseases, E.coli antibody positive, patients affected by non viral hepatic diseases, dialysis patients, pregnant women, hemolized, lipemic, etc.). A value of specificity of 100% was assessed.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed. Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the value of specificity. Frozen specimens have been tested, as well, to check for interferences due to collection and storage. No interference was observed.

2.2 Diagnostic Sensitivity

It defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of specific analyte. The diagnostic sensitivity has been assessed externally on a total number of 348 specimens; a diagnostic sensitivity of 100% was found. Internally more than other 50 positive samples were tested, providing a value of diagnostic sensitivity of again 100%. Positive samples from infections carried out by different genotypes of HCV were tested as well.

Furthermore, most of seroconversion panels available from Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) and Zeptometrix, USA, (HCV) have been studied.

Results are reported below for some of them.

Panel	N° samples	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Note:

1. Positive samples detected
2. HCV v.3.0

Finally the Product has been tested on the panel EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, supplied by the Etablissement Francais Du Sang (EFS), France, with the following results:

EFS Panel Ac HCV

sample	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Average value
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negative
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positive
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positive
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positive
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positive
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positive

3. PRECISION

It has been calculated on five samples, one negative and four positives examined in 4 replicates each in six separate runs. The precision, obtained for both protocols, is equivalent.

Results are reported as follows:

Intra-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1st Lot (short incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	S/Co Mean	Within Run	Between Run	Total
Negative	0.03	6.66	10.56	12.48
Positives	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Intra-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1st Lot (long incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	S/Co Mean	Within Run	Between Run	Total
Negative	0.04	4.67	12.34	13.19
Positives	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Inter-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1st, 2nd and 3rd Lot (short incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
Negative	8,65	8,29	6,13	
Calibrator	4,98	4,44	5,38	
Positive	4,11	3,11	1,37	

The variability shown in the tables above did not result in sample misclassification.

S. SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different ($\pm 50\%$) from OD reported on QC	- incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation) - error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) - contamination of Substrate or Conjugate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)
Low reproducible results	- not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) - contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers) - pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)
no colorimetric reaction after addition of substrate	- some reagent not pipetted - strong contamination of Conjugate or Substrate - errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)
too low reaction (too low ODs)	- incubation time too short, incubation temperature too low - incorrect conjugate dilution
too high reaction (too high ODs)	- incorrect conjugate dilution - incubation time too long, incubation temperature too high - water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization) - insufficient washing (conjugates not properly removed)
unexplainable outliers	- contamination of pipettes, tips or containers - inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)
too high within-run CV%	- reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temperature prior to use - plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
too high between-run CV%	- incubation conditions not constant (time, temperature) - controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order) - person-related variation

T. AUTOMATION

The procedures identified in this Instruction for Use are for manual testing only. When using automated instruments, follow the procedures that are contained in the operator's manual provided by the device manufacturer. Laboratories must follow their approved validation procedures to demonstrate compatibility of this product on automated systems.

U. LIMITATIONS

Repeatable false positive results, not confirmed by RIBA or similar confirmation techniques, were assessed as less than 0.1% of the normal population.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing have been observed to generate some false results.

BIBLIOGRAPHY

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Прочетете внимателно тази листовка, преди да извършите дозирането и се придържайте стриктно към инструкциите, които са представени.

Надеждността на резултатите е гарантирана единствено, ако инструкциите бъдат следвани внимателно.



Производител:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Тел. +39-0774-5791 - Факс +39-0774-353085

www.adaltis.net

bg

СИМВОЛИ, ИЗПОЛЗВАНИ В ЕТИКЕТИТЕ

Български BG							
	Медицински Продукт Диагностика ин витро	Номер на Каталог	Номер на Партида	Внимание, прочетете инструкциите за употреба	Граници на Температура	Използвайте До	Номер на Тест
				MICROPLATE	CONTROL+	CONTROL-	CAL
	Производител	Пазете от Слънчева Светлина	Дата на Производство	Микроплата	Положителна Контрола	Отрицателна Контрола	Калибратор
	CONJ	DILSPE	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 20X	DILAS	RCNS x mL
	Свързан	Разтворител Мостри	Субстрат TMB	Блокиращ (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Тампон за Концентрирано Измиване 20x	Разтворител за Анализ	Допълнете с x mL
	Биологичен риск	Опасност	Внимание				

Внимание:

Блокиращ Разтвор класифициран като: Разяждане на кожата 1A



- Предупреждение:**
Опасност
- Опасни компоненти, които определят етикетирването:**
Сярна киселина
- Указания за опасност:**
H314 Причинява тежки кожни изгаряния и увреждане на очите.
- Препоръки за предпазливост:**
P260 Не вдъшвайте прахове, дим, газ, мъгла, изпарения, аерозоли.
P303+P361+P353 ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА (или косата): Незабавно свалете цялото замърсено облекло. Изплакнете кожата с вода / вземете душ.
P305+P351+P338 В СЛУЧАЙ НА КОНТАКТ С ОЧИТЕ: изплакнете обилно в продължение на няколко минути. Свалете, ако се използват, контактни лещи, ако това е възможно. Продължете да изплаквате.
P310 Потърсете незабавно ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или медицинска помощ.
P405 Съхранявайте под ключ.
P501 Изхвърлете съдържанието на контейнера в съответствие с локалните, регионалните, националните, международните разпоредби.

Внимание:

Отрицателна Контрола, Положителна контрола, Калибратор, Конюгат, Разтворител Мостри, Разтворител на Анализа и Тампон за Концентрирано измиване 20X класифицирани като: Чувств. за кожата. 1



- Предупреждение:**
Внимание
- Опасни компоненти, които определят етикетирването:**
Смес от: 5-хлор-2-метил-2Н-изотиазол-3-он [ЕС номер 247-500-7]; 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [ЕС номер 220-239-6] (3:1)
- Указания за опасност:**
H317 Може да причини алергична кожна реакция.
- Препоръки за предпазливост:**
P261 Избягвайте вдъшването на прах, дим, газ, мъгла, изпарения, аерозоли.
P280 Използвайте предпазни ръкавици, предпазно облекло. Пазете очите, лицето.
P321 Специално третиране (виж на този етикет).
P333+P313 В случай на раздразнение на кожата или разкъсване, направете : консултация с лекар.
P302 + P352 ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно с вода.
P501 Изхвърлете съдържанието/контейнера в съответствие с локалните/регионалните/националните/международните разпоредби.

За листовките за Безопасност се консултирайте: www.adaltis.net.

А. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Имуноензимно дозиране (ELISA) от четвърта генерация за определяне на антитела анти Вирус на Хепатит С in плазми (EDTA, Хепарин и Цитрат) и човешки серуми. Комплектът може да бъде използван за търсене на антитела в кръвните проби на пациенти, заразени от HCV.

Само за диагностична употреба in vitro.

В. ВЪВЕДЕНИЕ

Световната Организация на Здравеопазването (OMS) определя инфекцията от Хепатит С по следния начин:

“Хепатит С е вирусна инфекция на черния дроб, която спада към хепатити “А и В” парентерално предадени до идентифициране на агента причинител през 1989. Откритието и характеризирането на вируса на хепатит С (HCV) води до разбиране за неговата първична роля при хепатитите след преливане на кръв и да води до трайни инфекции”.

HCV се предава основно при директен контакт с човешка кръв. Най-големите причини за HCV в света са употребата на кръв, която не е проверена за преливания и повторната употреба на игли и спринцовки, неподходящо стерилизирани.

В момента не е налична нито една ваксина, която да предотврати хепатит С и лечението на хронични хепатити С е прекалено скъпо, за да могат народите от развиващите се страни, да могат да си го позволят. Следователно, най-голямото въздействие върху болните от хепатит С ще бъде постигнато насочвайки усилията върху намаляване на рисковете на предаването на HCV в болница (преливане на кръв, несигурни инжекции) и поведение с висок риск (инжектиране на дроги).

Вирусът на хепатит С (HCV) е един от вирусите (А, В, С, D, и Е), които са отговорни за увеличаването на случаите на вирусен хепатит. Това е един вирус RNA от семейството Flaviviridae, което показва, че има тесен спектър на приемници. Човешките същества и шимпанзетата са единствените видове, склонни към инфекция и двата вида развиват едни и същи болести. Една важна характеристика на вируса е отнositелната мутагенност на генома, което вероятно се свързва с високата мутагенност (80%) и предизвиква хронични инфекции. HCV е обединен с различни точно разграничени генотипи, които могат да бъдат важни при определянето на болестта и повлияване на лечение.

Инкубационният период на инфекция от HCV преди появяването на клиничните симптоми е от 15 до 150 дни. При острите инфекции, най-общите симптоми са умора и жълтеница в по-голямата част от случаите (между 60% и 70%), случаите които развиват хронична инфекция, протичат без симптоми. Около 80% от новите инфектирани пациенти развива хронична инфекция. Цирозите се развиват приблизително от 10 % до 20% в хора, които имат хронична инфекция, докато рак на черния дроб се появява между 1% и 5% от хората, които имат хронична инфекция за един период от 20 до 30 години. По-голямата част от пациентите, които страдат от рак на черния дроб, при които няма инфекция от хепатит В, показват инфекция от HCV. Механизмът, поради който инфекцията от HCV води до рак на черния дроб все още не е много ясен. Хепатит С увеличава сериозността на заболяванията

на черния дроб, когато е препокрива с други заболявания на черния дроб. По-специално, чернодробните заболявания се развиват по-бързо при лица с чернодробни заболявания, предизвикани от прекомерна употреба на алкохол и с инфекция от HCV. HCV се предава основно при директен контакт с инфектирана кръв. Предаването посредством преливане на кръв, не изследвана за HCV, повторната употреба на игли, спринцовки и други медицински изделия, неподходящо стерилизирани, или посредством размяна на игли между хора, употребяващи дрога. Предаването по сексуален или перинатален път, може също да се получи, но не толкова често. Други начини за предаване, са свързани с практики на поведение, социални, културни (пирсинг по тялото, обрязване и татуировки) могат да настъпят, ако се използват неподходящо стерилизирани инструменти. HCV не се предава посредством кихане, прегръдки, кашлица, храна или вода, като и чрез споделяте прибори или чаши или чрез случаен контакт.

Както в развитите страни, така и в развиващите се, групите под висок риск включват потребителите на дрога за инжектиране, получателите на непроверена кръв, хемофилици, които са подложени на диализа и лица с голям брой сексуални партньори. В развитите страни, се предполага, че 90% от хората с хронична инфекция от HCV, са основно потребители на дроги за инжектиране и тези с история на преливане на не изследвана кръв или кръвни продукти. В по-голяма част от развиващите се страни, където все още се използва не изследвана кръв и производни, основното средство за предаване на инфекцията са инструментите за инжектиране и преливане на не контролирана кръв. В допълнение, хората, които практикуват жертвени ритуали и обрязване са изложени на риск, ако използват или използват повторно не стерилизирани инструменти.

OMS предвижда, че около 170 милиона човека, 3% от световното население са заразени от HCV и са изложени на риск от развиване на цироза и/или рак на черния дроб. Разпространението на инфекцията HCV в Африка, Средния Изток, Югоизточна Азия и Западната част на Тихия океан е високо, в сравнение със Северна Америка и Европа.

Диагностичните тестове за HCV се използват, за да се избегне инфекцията посредством скрининг на донори на кръв и плазма, за да се стабилизира клиничната диагноза и да се взимат по-добре решения, относно лечението на пациентите. Диагностичните тестове налични днес, се основават на имуноензимни анализи (EIA) за откриване на специфични антитела на HCV. Системата EIA може да отчете повече от 95% от пациентите, хронично инфектирани, но само от 50% до 70% от острите случаи на инфекции. Рекомбинантен имуоблот анализ (RIBA), който идентифицира антителата, които реагират с индивидуални антигени HCV, често се използва като един допълнителен тестове за потвърждаването на положителен резултат EIA. Тест за HCV, базирани върху разпространяването на RNA (пр. PCR, анализ на свързано DNA) е използван също така и за потвърждение на серологичния резултат и за предписване на една ефикасна антивирусна терапия. Положителения резултат показва наличието на активна инфекция и възможност за разпространяване на инфекцията и/или развиването на хронични заболявания на черния дроб.

Противовирусни медикаменти, като интерферон, приеман самостоятелно или в комбинация с

рибавирин, може да се използва за лекуване на лица с хроничен хепатит С, но разходите по лечението са много високи. Лечението само с интерферон е ефикасно в около 10%-20% от пациентите. Интерферонът, комбиниран с рибавирин е ефикасен в 30%-50% от пациентите. Рибавиринът не е ефективен, когато се използва самостоятелно.

Няма никаква ефикасна ваксина срещу HCV. Научните изследвания продължават, но високата мутагенност на генома на HCV усложнява разработването на ваксина. Липсата на познаване на някои от имуно-защитните отговори след инфекция на HCV не позволява също така търсене на ваксина. Дори не се знае дали имунната система е в състояние да отстрани вируса.

Някое от проучванията, независимо от това е показало наличието на антитела неутрализиращи вируса при пациентите, заразени от HCV. При липса на ваксина, трябва да бъдат взети всички предпазни мерки, за да се избегне инфекцията, включително (а) скрининг и тест на кръвта и органите; (б) деактивиране на вируса на плазми и други продукти; (с) нарастване и поддържане на контрола на инфекцията, както и правилната стерилизация на медицинските и дентални инструменти; (д) насърчаването за промени в поведението между обикновените хора, за да се намали прекомерната употреба на инжекции и практиката за използване на необезопасени инжекции; (е) намаляването на риска за лица, които употребяват дрога и практикуват секс без използване на предпазни средства.

Геномът, код за структурните компоненти, един нуклеокапсиден протеин и гликопротеини на обвивката, и функционалните съставки, участващи в повтаряемостта на вируса и в преработката на неговите протеини. Нуклеокапсидният кодиращ регион изглежда, че е най-консервативен между изолираните, постигнати в света.

С. НАЧАЛО НА ТЕСТА

Микроплочките са покрити с антигени HCV-специфични, произхождащи от регионите "core" и "ns" кодиращи за консервативите и имунодоминантните антигенни детерминанти (Core peptide, рекомбинантен NS3, NS4 и NS5 пептиди). Основната част първо се третира с разреждана мостра и антителата HCV са хванати, ако са налични, от антигените. След като са измити всички други компоненти на мострата, при втората инкубация, свързани антителата HCV, IgG и IgM са открити от добавянето на специфични антитела, поликлонирани анти IgG&M, етикетирани с пероксидаза (HRP). Хванатият ензим върху солидна основа, реагирайки със субстратната смес TMB, генерира оптичен сигнал, който е пропорционален на количеството антитела анти HCV налични в мострата. Стойността на cut-off позволява да се интерпретират оптичните плътности в положителни и отрицателни резултати в антитела HCV.

Д. КОМПОНЕНТИ

Комплектът съдържа реагенти за 96 теста (код 071067), 192 теста (код 071064), или 480 теста (код 071068).

Микроплата	1
Отрицателна Контрола	1x4 mL/флакон
Положителна Контрола	1x2 mL/флакон
Калибратор	2 флакона
Разтвор за Измиване конц. 20x	1x50 mL/флакон
Свързан	1x16 mL/флакон
Разтворител на Мостри	1x50 mL/флакон
Субстрат TMB	1x16 mL/флакон
Блокиращ	1x15 mL/флакон
Разтворител за Анализ	1x8 mL/флакон
Лист за покриване на плоча	2
Брой тестове	96
Код	071067

Микроплата	2
Отрицателна Контрола	2x4 mL/флакона
Положителна Контрола	1x4 mL/флакон
Калибратор	3 флакона
Разтвор за Измиване конц. 20x	2x50 mL/флакона
Свързан	2x16 mL/флакона
Разтворител на Мостри	2x50 mL/флакона
Субстрат TMB	2x16 mL/флакона
Блокиращ	2x15 mL/флакона
Разтворител за Анализ	2x8 mL/флакона
Лист за покриване на плоча	4
Брой тестове	192
Код	071064

Микроплата	5
Отрицателна Контрола	1x20 mL/флакон
Положителна Контрола	1x10 mL/флакон
Калибратор	7 флакона
Разтвор за Измиване конц. 20x	5x50 mL/флакона
Свързан	2x40 mL/флакона
Разтворител на Мостри	5x50 mL/флакона
Субстрат TMB	2x40 mL/флакона
Блокиращ	2x40 mL/флакона
Разтворител за Анализ	1x40 mL/флакон
Лист за покриване на плоча	10
Брой тестове	480
Код	071068

1. Микроплата

12 лентички 8 микроелементи, покрити с ядрен пептид, рекомбинантен NS3, NS4 и NS5 пептиди. Пластините са запечатани в един алуминиев плик. Изчакайте микроплочата да се загрее на стайна температура (18...24°C) преди да отворите плика. Заредете неизползваните ленти в плика и съхранявайте на 2...8°C.

2. Отрицателна Контрола

Проверка на готов за употреба продукт. Съдържа тампон натриев цитрат 10 mM с pH 6.0 ± 0.1, 2% казеин и 0.1% Проклин 150 като консервант. Отрицателната проверка е кодирана с маслено зелен цвят.

3. Положителна Контрола

Проверка на готов за употреба продукт. Съдържа 1% протеини от кози серум, човешки антитела, положителни на HCV, тампон натриев цитрат 10 mM с pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% натриев азид и 0.1% Проклин 150 като консерванти. Положителна Контрола е кодирана с тъмно зелен цвят.

Важна забележка: Отсъствието на жизнени патогени агенти в Положителна Контрола, не може да бъде напълно гарантирано и следователно, реагентът трябва да бъде третиран като

потенциално инфектиран, в съответствие с добрите лабораторни практики.

4. Калибратор

Разтворим калибратор. Трябва да се разтвори с обем вода, степен EIA представен на етикета. Съдържа протеини от фетален волски серум, човешки антитела на HCV чието съдържание е калибрирано на базата NIBSC Working Standard код 06/188-006, 10mM тампон натриев цитрат с pH 6.0±0.1, 0.3 mg/mL гентамицин солфат и 0.1% Проклин 150 като консерванти.

Важна забележка: Отсъствието на жизнени патогени агенти в Калибратора, не може да бъде напълно гарантирано, и следователно, реагентът трябва да бъде третиран като потенциално инфектиран, в съответствие с добрите лабораторни практики.

Забележка: обемът, необходим, за да се разтвори съдържанието на епруветката може да се различава от партида до партида. Моля, използвайте правилния обем, представен на етикета.

5. Концентриран Разтвор за Измиване 20x

Концентриран разтвор 20X. След разреждане, разтворът за измиване (разреден тампон за измиване) съдържа тампон фосфат 10 mM с pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 и 0.05% Проклин 150. След разреждане, разтворът за измиване остава стабилен за 1 седмица на 2...8°C.

6. Свързан

Реагент готов за употреба и кодиран с червен цвят. Съдържа пероксидаза от хрян, свързана с антитела поликлонали от коза с IgG и човешки IgM, 5% BSA, тампон Цитрат 10 mM с pH 6.4 ± 0.1, 0.1% Проклин и 0.05% Tween 20 като консерванти.

7. Субстрат TMB

Компонент готов за употреба продукт. Съдържа тампон цитрат-фосфат 50 mM с pH 3.5-3.8, диметил сулфоксид на 4%, 0.03% тетраметилбензидин (TMB) и 0.02% водороден пероксид (H₂O₂). Смесете внимателно преди употреба.

Забележка: Трябва да бъде съхраняван защитен от светлина, тъй като е чувствителен на силна светлина.

8. Разтворител за Анализ

Компонент готов за употреба продукт. Съдържа кози серум, буфериран разтвор на Tris 10mM с pH 8.0±0.1, съдържащ 0.1% Проклин 150 и 0.09% натриев азид за предварително третиране на мострите и на проверките в плоча, блокирайки смущенията.

9. Блокиращ

Компонент: готов за употреба продукт. Съдържа един разтвор 0.3 M на H₂SO₄. Смесете внимателно преди употреба.

10. Разтворител Мостра

Компонент: готов за употреба и кодиран с тъмно зелен цвят. Съдържа 1% казеин, тампон натриев цитрат 10 mM с pH 6.0 ± 0.1 и 0.1% Проклин 150 като консервант. Използвайте, за да разредит мострата.

Забележка: Разтворителят сменя цвета си от маслено зелен до тъмно зелено-син при наличие на мострата.

Е. ИЗИСКАНИ МАТЕРИАЛИ, НО НЕ ДОСТАВЕНИ

1. Калибрирани микро-капкомери (200 µL и 10 µL) и игли за еднократна употреба.
2. Вода от степен EIA (двойно дестилирана или дейонизирана, обработена с активен въглен за да се отстранят химичните оксиданти, използвани като дезинфектанти).
3. Таймер с интервал от време 60 мин. или повече.
4. листов абсорбираща машина.
5. Термостатичен инкубатор за микроплочи ELISA, в състояние на предостави една температура от +37°C.
6. Калибриран четец на микроклетки ELISA с разчитане на 450nm по възможност с филтри на 620-630nm за определяне на празните клетки.
7. Калибрирано устройство за измиване на микроплочи ELISA.
8. Vortex или подобни инструменти за смесване.

Ф. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Комплектът трябва да бъде използван само от специализиран технически персонал и правилно обучен, под наблюдението на отговорния лекар от лабораторията. Прочетете внимателно тази листовка, преди да извършите дозирането и се придържайте стриктно към инструкциите, които са представени.
2. Прочетете внимателно Листовката за Безопасност (SDS) преди да извършите дозирането.
3. Когато комплектът е използван за скрининг на кръвна проба и компоненти на кръвта, трябва да бъде използвана лаборатория със сертификат и квалифицирана от националния орган в тази сфера (Министерство на Здравеопазването или подобен), за да се извършат този тип анализи.
4. Целият персонал, участващ в извършването на анализа, трябва да носи защитни облекла за лаборатория, ръкавици от латекс без талк и очила. Употребата на всякакви остри устройства (игли) или режещи (остриета) трябва да бъде избегната. Целият участващ персонал, трябва да бъде обучен за процедурите за лична безопасност, както се препоръчва от Центъра за Контрол на Заболяванията в Atlanta, US. и представен в публикация на Националния Институт за Здравеопазване: "Лична безопасност в Микробиологичните и Био-медицински лаборатории", изд. 1984.
5. Целият персонал, ангажиран при боравенето с мострите трябва да бъде ваксиниран за HBV и HAV, поради което са налични сигурни и ефикасни ваксини.
6. Помещението на лабораторията трябва да бъде проверено, за да се избегнат замърсявания от прах и микробиологични агенти във въздуха, когато се отварят епруветките и микроплочата на комплекта и когато се извършва теста. Защитете хромоген/субстрата TMB от силната светлина и избягвайте вибрациите на работния плот, след започване на теста.
7. От получаването, съхранявайте комплекта на 2...8°C в хладилник или студена камера на контролирана температура.
8. Не сменяйте компонентите между различни партии на комплекта. Препоръчва се да не се разменят компонентите на два комплекта от една и съща партида.
9. Проверете дали реагентите са ясни и не съдържат големи количества частици или агрегати. Ако това се случи, предупредете наблюдателя на лабораторията, за да се започнат необходимите процедури за смяна на комплекта.
10. Избягвайте кръстосани замърсявания между мостри на серуми и плазми използвайки остриета за еднократна употреба и ги сменяйте след всяка мостра.

11. Избягвайте кръстосани замърсявания между реагентите на комплекта използвайте острията за еднократна употреба и ги сменяйте за употребата на всеки компонент.
12. Не използвайте комплекта след датата на срока на годност, отбелязана върху вътрешната опаковка и върху етикета на всяка отделна епруветка във вътрешността.
13. Третирайте всички мостри като потенциално инфектирани. Всички човешки серуми трябва да бъдат третирани според Ниво 2 на Био-Безопасност, както е препоръчано от центъра за Контрол на Заболяванията, Atlanta, US. заедно с представеното от публикацията на института за Здравеопазване: "Био-Безопасност в Микробиологичните и Био-медицински лаборатории", изд. 1984.
14. Употребата на пластмасови съдове за еднократна употреба се препоръчва за приготвянето на течните компоненти или за компонентите, прехвърлени в автоматизирани станции, за да се избегнат кръстосани заразявания.
15. Отпадъчните продукти по време на употребата на комплекта трябва да бъдат разтоварвани съгласно националните директиви и закони, отнасящи се до отпадъци от химични вещества и биологични отпадъци от лаборатории. По-специално, течните отпадъци, генерирани от процедурата на измиване, остатъци от изследвания и от мостри трябва да бъдат третирани като потенциално опасни материали и обезвредени преди да бъдат изхвърлени. Препоръчва се да се обезвреждат с разтвор от натриев хипохлорид на 10% за 16-18 часа или деактивиране с обработка в автоклав на 121°C за 20 минути.
16. Случайни разсипвания на мострите по време на операциите трябва да бъдат поети от листовите хартия, напоени с натриев хипохлорит и след това изплакнати с вода. Листовите хартия след това трябва да се изхвърлят в специален контейнер за отпадъци на биологични материали.
17. Блокиращият разтвор съдържа сярна киселина 0.3 M. Избягвайте контакт с кожата и очите. В случай на контакт, изплакнете веднага и обилно с вода.
18. Реактивните разтвори, които съдържат натриев азид или тимерозал като консерванти, трябва да бъдат третирани, следвайки инструкциите и ответните закони, действащи в Държавата, в която се работи. Отстраняването на разтворите, съдържащи натриев азид, предвижда употребата на течаща вода в големи количества. Обърнете внимание на факта, че натриевият азид може да образува експлозивни смеси при продължителен контакт с олово и мед.
19. Не пушете, не се хранете или не използвайте козметика в зоните, в които се работи с мостри и реактивни разтвори.
20. Други отпадъчни материали генерирани от употребата на комплекта (например: острията, използвани за проверки и мостри, използвани микроплочи) трябва да бъдат считани за потенциално инфектирани и изхвърляни съгласно националните директиви и законите относно изхвърляне на отпадъци от лаборатории.
21. Не използвайте уста за да боравите с капкомера.

G. МОСТРИ: ПРИГОТВЯНЕ И ПРЕПОРЪКИ

1. Кръвта се взема асептично за венозно взимане и плазмите или серумите за приготвени, използвайки стандартните техники за приготвяне на мострите за клинични анализи в лаборатория. Никакво влияние не е наблюдавано при приготвянето на мострата с цитрат, EDTA или хепарин.

2. Избягвайте всякакво добавяне на консерванти към мострите; особено натриев азид, който може да повлияе на ензиматичната дейност на конюгата, генерирайки резултати с фалшиви негативи.
3. Мострите трябва да бъдат ясно идентифицирани с кодове или имена, за да се избегне объркване при интерпретацията на резултатите. Когато комплектът е използван за скрининг на кръвна проба, силно се препоръчва да се поставят етикети с баркодове и да се разчитат електронно.
4. Хемолизирани мостри (червени) и видимо хиперлипемични (млекоподобни) трябва да бъдат изхвърлени, защото могат да генерират фалшиви резултати. Мострите, съдържащи остатъци от фибрин или големи частици или влакна и микробиологични тела, трябва да бъдат изхвърлени, тъй като могат да породят фалшиви резултати.
5. Серуми и плазми, могат да бъдат съхранявани на +2...8°C до пет работни дни след взимане на кръв. За по-дълго съхранение, мострите могат да бъдат замразени на -20°C за няколко месеца. Всяка замразена мостра не може да бъде замразена и размразена повече от един път, тъй като това генерира частици, които могат да повлияят на резултата от теста.
6. Ако са налични частици, центрифугирани на 2.000 gpm за 20 минути или филтрирани с филтри на 0.2-0.8µm за да се почисти тампона за тестване.

H. ПОДГОТОВКА НА КОМПОНЕНТИТЕ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Изследванията, извършени върху един отворен комплект и не са показали никаква значителна загуба на действие до 1 повторна употреба на същия материал в разстояние от 6 месеца.

1. Микро плочи:

Микроплочата трябва да достигне температурата на помещението (поне 1h) преди да отворите плика. Проверете дали десиканта не е станал тъмно зелен, показвайки дефект на съхранение. В този случай се свържете с отдел обслужване на клиенти Adaltis. Лентите, които не са използвани, трябва да бъдат поставени в специалното пликче, при наличие на доставен десикант, плътно запечатани и съхранявани на 2...8°C. След първото отваряне, останалите ленти са стабилни, до когато индикаторът за влажност, наличен в плика на десиканта се промени от жълто до зелено.

2. Отрицателна контрола:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

3. Положителна контрола:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба. Третирайте този компонент, като потенциално инфектиран.

4. Калибратор:

Разтворете внимателно разтворимото съдържание на епруветката с обем вода от степен EIA, представено върху етикета. Смесване на vortex преди употреба.

Третирайте този компонент като потенциално инфектиран.

Забележка: След разтваряне калибраторът не е стабилен. Съхранявайте на равни части на -20°C.

5. Концентриран разтвор за измиване 20х: (флакон от 50 mL):

Цялото съдържание на разтвора, концентриран 20х трябва да бъде разтворен с двойно дестилирана вода, 1000 mL (обема е представен на етикета) и смесен внимателно преди употреба. В момента, в който в разтвора се наблюдава образуване на кристали, обърнете внимание да разтворите цялото съдържание. При приготвяне, като цяло избягвайте пяната, тъй като наличието на мехури може да намали ефикасността на измиването.

Забележка: След разреждане, разтворът за измиване е стабилен за 1 седмица на +2..8°C.

6. Конюгат:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба. Бъдете внимателни, за да не замърсите течността с химични оксиданти, прахове или микроби, налични във въздуха. Ако този компонент трябва да бъде прехвърлен, използвайте само пластмасови контейнери, по възможност стерилни.

7. Субстрат ТМВ:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба. Бъдете внимателни, за да не замърсите течността с химични оксиданти, прахове или микроби, налични във въздуха. Не излагайте на силно осветление, оксидиращи агенти и метални повърхности. Ако този компонент трябва да бъде прехвърлен, използвайте само пластмасови контейнери, по възможност стерилни.

8. Разтворител на Анализа:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

9. Блокиращ Разтвор:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

10. Разтворител на Мострата:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

I. ИНСТРУМЕНТИ ИЗПОЛЗВАНИ В КОМБИНАЦИЯ С КОМПЛЕКТА

1. Микро-капкомерите трябва да бъдат калибрирани за да отпускат правилния обем, изискан от анализа и трябва да бъдат подлагани на редовно обеззаразяване (денатуриран алкохол, белина 10%, болничен дезинфекциращ разтвор) на тези части, които могат да влязат случайно в контакт с мострата. Те трябва да бъдат поддържани под контрол за да се покаже една неточност от 1% и една точност от $\pm 2\%$. Обеззаразяването на пръски или остатъци от компоненти на комплекта трябва да бъде извършвано редовно.
2. Инкубаторът ELISA трябва да бъде калибриран на 37°C (отклонение от $\pm 0.5^\circ\text{C}$) и редовно проверяван, за да се подsigури поддържането на правилната температура. И двата инкубатора сух и с вода могат да бъдат използвани за инкубации, ако инструментите са конвалидирани за инкубация на тестове ELISA.
3. Устройството за измиване ELISA е особено важно за цялостната успеваемост на анализа. Устройството за измиване трябва да бъде валидирано внимателно и правилно оптимизирано. Обикновено, са достатъчни 4-5 цикъла на измиване (аспирация + разпределяне на 350 μL разтвор за измиване = 1 цикъл) за да се гарантира, че анализът ще даде очаквания

резултат. Препоръчва се един интервал на потапяне от 20-30 секунди между циклите. За да се определи правилно техният брой, се препоръчва да се извърши един пробен тест с проверки на комплекта и контролни мостри, добре характеризирани, като положителни или отрицателни и проверете съответствието на стойностите, посочени по-долу в раздел О "Проверка на вътрешното качество". Редовното калибриране на подадения обем и поддръжката на устройството за измиване (обеззаразяване и почистването на иглите) трябва да бъде извършено според инструкциите на производителя.

4. Сроковете на инкубация имат толеранс от $\pm 5\%$.

- ✓ Метод на Кратка Инкубация (за 1^a/2^a инкубация толерантността е в рамките между 43 мин. и 47 мин.; за 3^a инкубация толерантността е в рамките между 14 и 16 мин.).
- ✓ Метод на Стандартна Инкубация (за 1^a инкубация толерантността е в рамките между 57 мин. и 63 мин.; за 2^a и 3^a инкубация толерантността е в рамките между 29 и 31 мин.).

5. Четецът на микроплати ELISA трябва да бъде оборудван с филтър на разчитане 450nm и по-добре с един втори филтър (620-630nm) за операциите на празна клетка. Неговите стандартни характеристики трябва да бъдат (а) ширина на лента $\leq 10\text{nm}$; (b) интервал на абсорбция от 0 до ≥ 2.0 ; (c) линейност ≥ 2.0 ; (d) повтаряемост $\geq 1\%$. Празните клетки са определени според инструкциите, представени в раздел "Процедура на Анализа". Оптичната система на четеца трябва да бъде калибрирана редовно, за да се гарантира правилното измерване на оптичната плътност. Поддръжката трябва да бъде извършвана редовно според инструкциите на производителя.
6. Когато се използва една автоматизирана станция за работа за комплекта ELISA, всички критични стъпки (разпределяне, инкубация, измиване, разчитане, манипулация на данните) трябва да бъдат внимателно проверени, калибрирани и редовно поддръжани, за да се запази съответствието със стойностите, представени в разделите О "Проверка на вътрешното качество". Протоколът на анализа трябва да бъде инсталиран в оперативната система на устройството и заверено като за устройство за миене и четец. Освен това, частта от станцията, която работи с течните компоненти (разпределяне и измиване) трябва да бъде валидирана и правилно настроена. Особено внимание трябва да се обърне за да се избегне повличането от страна на иглите, използване за разпределяне и измиване. Това трябва да бъде разработено и контролирано, за да се сведе до минимум възможността от заразяване на близките клетки. Употребата на автоматизирани работни станции ELISA се препоръчва за скрининг на кръвта, когато броят на мостри, които да бъдат тествани, е по-голям от 20-30 за хода на машината.

II. ПРОВЕРКИ И ОПЕРАЦИИ ПРЕДИ АНАЛИЗ

1. Проверете датата на срока на годност на комплекта, отпечатана върху етикета от външната страна на кутията. Не използвайте комплекта, ако е с изтекъл срок.
2. Проверете дали течните компоненти не са замърсени от частици или агрегати, видими с човешко око. Проверете дали Субстратът ТМВ е безцветен или бледо синьо, като засмуквате малка част от същия, с един стерилен, пластмасов, прозрачен капкомер. Проверете дали не е настъпило никакво счупване на опаковката по време на транспорта и не е налично изтичане на

течности във вътрешността на кутията. Проверете дали алуминиевият плик, съдържащ микроплочата, не е пробит или повреден.

3. Разтворете цялото съдържание на разтвора за Измиване, концентриран 20x, както е описано по-горе.
4. Разтворете калибратора, както е описано по-горе.
5. Позволете на всички компоненти на комплекта да достигнат температурата на помещението (около 1h) и след това смесете, както е описано.
6. Настройте инкубатора ELISA на +37°C и подгответе устройството за измиване ELISA като го намокрете с разрежения разтвор за измиване, според инструкции на производителя. Задайте правилния брой цикъла на измиване, според представеното в раздел, както е описано в раздел I.3.
7. Проверете дали четецът ELISA е включен от поне 20 минути преди разчитането.
8. Ако се използва една автоматизирана работна станция, включете я, проверете настройките и се уверете, че използвате правилния протокол.
9. Проверете дали микро-капкомерите са настроени на дадения обем.
10. Проверете дали всички инструменти са налични и готови за употреба.
11. В случай на проблеми, не продължавайте с теста и информирайте отговорника.

М. ПРОЦЕДУРА НА АНАЛИЗ

Анализът трябва да бъде извършен съгласно представеното в последствие, като се обърне внимание да се запази същата инкубация за всички мостри за тестване.

Анализът може да бъде извършен посредством две процедури на инкубация. Изберете най-подходящия за вашия регламент:

1. Стандартна инкубация (1^a инкубация 60 минути, 2^a и 3^a инкубация 30 минути)
2. Кратка инкубация (1^a и 2^a инкубация 45 минути, 3^a инкубация 15 минути)

1. Инкубация Стандартна - Ръчен Анализ:

1. Въведете правилния брой микро шахти в специалната подпора. Оставете първата клетка празна за операциите с празна клетка.
2. Разпределете 200 µL от Отрицателна Проверка тройно, 200 µL от Калибратор двойно и 200 µL от Положителна Проверка единично в подходящите клетки. Не разреждайте Проверки и Калибратор тъй като вече предварително разреждени и готови за употреба!
3. Добавете 200 µL Разтворител на Мостри на всички клетки на мостри; след това разпределете 10 µL мостра във всяка клетка предварително идентифицирана. Раздвижете внимателно плочата, като избягвате препълвания и замърсяване на близките клетки, за да разтворите напълно мострата в нейния разтворител.

Важна забележка: Проверете дали цветът на Разредителя на Мострата, след добавянето на мострата, варира от светло зелено до тъмно синьо-зелено, посочвайки, че мострата е била добавена.

4. Разпределете 50 µL от Разтворител за Анализ във всичките клетки за проверка/калибратор и на мострите. Проверете дали цветът на мострите се променя към тъмно син.
5. Изолирайте микроплочата за **60 мин. на +37°C**.
Важна забележка: Лентите трябва да бъдат покрити със специалния предоставен залепващ

лист, само когато тестът е извършен ръчно. Не покривайте лентите, когато се използва един автоматизиран инструмент ELISA.

6. Измийте микроплочата с едно автоматично устройство за измиване, чрез освобождаване и аспирация на 350 µL/клетка от разтвора за измиване, разтворен както е представено в раздел I.3.
7. Поставете с капкомер 100 µL на Ензимния Конюгат във всичките клетки с изключение на празната и покрийте със залепващ лист. Проверете дали този компонент с червен цвят е бил сипан във всички клетки, с изключение на A1.

Важна забележка: Внимание да не ударите повърхността на вътрешната пластмаса на клетката с върха, пълен с Конюгат. Може да настъпи замърсяване.

8. Изолирайте микроплочата за **30 мин. на +37°C**.
9. Измийте клетките, както е представено в раздел I.3.
10. Поставете с капкомер 100 µL от сместа на субстрата TMB във всяка клетка, също и в празната. Изолирайте микроплочата на **стайна температура (18-24°C) за 30 минути**.

Важна забележка: Не излагайте на силно директно осветление. Може да доведе до високи дъна.

11. Поставете с капкомер 100 µL от блокиращия разтвор във всяко кладенче, като използвате същата последователност на поставяне на капки, описана в точка 10 за да спрете ензимната реакция. Добавянето на Блокиращ Разтвор ще промени позитивната проверка и положителните мостри от синьо до жълто.
12. Измерете силата на цвета на разтвора във всяка клетка, както е описано в раздел 1.5, с един филтър за разчитане 450 nm и по възможност с един филтър 620-630 nm за операциите с празна клетка в позиция A1 на микроплоча.

Важни забележки:

1. Ако вторият филтър не е на разположение, уверете се, че не са налични дигитални отпечатъци на дъното на микроплочата, преди разчитането на 450nm. Подобни отпечатъци биха могли да генерират фалшиви положителни резултати.
2. Разчитането трябва да бъде извършено веднага след добавянето на Блокиращия Разтвор и при всички случаи, никога по-късно от 20 минути след това добавяне. Може да настъпи една лека самоокисидация на субстрата и да доведе до резултат на високо дъно.
3. Разбъркването на 350 ± 150 грт по време на инкубация е показало, че чувствителността на дозиране се увеличава с около 20%.

2. Инкубация Кратка - Ръчен Анализ:

1. Въведете правилния брой микро шахти в специалната подпора. Оставете първата клетка празна за операциите с празна клетка.
2. Разпределете 200 µL от Отрицателна Проверка тройно, 200 µL от Калибратор двойно и 200 µL от Положителна Проверка единично в подходящите клетки. Не разреждайте Проверки и Калибратор тъй като вече предварително разреждени и готови за употреба!
3. Добавете 200 µL Разтворител на Мостри на всички клетки на мостри; след това разпределете 10 µL мостра във всяка клетка предварително идентифицирана. Раздвижете внимателно плочата, като избягвате препълвания и

замърсяване на близките клетки, за да разтворите напълно мострата в нейния разтворител.

Важна забележка: Проверете дали цветът на Разредителя на Мострата, след добавянето на мострата, варира от светло зелено до тъмно синьо-зелено, посочвайки, че мострата е била добавена.

- Разпределете 50 µL от Разтворител за Анализ във всичките клетки за проверка/калибратор и на мострите. Проверете дали цветът на мострите преминава в тъмно син.
- Изолирайте микроплочата за **45 мин. на +37°C**.
Важна забележка: Лентите трябва да бъдат покрити със специалния предоставен залепващ лист, само когато тестът е извършен ръчно. Не покривайте лентите, когато се използва един автоматизиран инструмент ELISA.
- Измийте микроплочата с едно автоматично устройство за измиване, чрез освобождаване и аспирация на 350 µL/клетка от разтвора за измиване, разтворен както е представено в раздел I.3.
- Поставете с капкомер 100 µL на Ензимния Конюгат във всичките клетки с изключение на празната и покрийте със залепващ лист. Проверете дали този компонент с червен цвят е бил сипан във всички клетки, с изключение на A1.

Важна забележка: Внимание да не ударите повърхността на вътрешната пластмаса на клетката с върха, пълен с конюгат. Може да настъпи замърсяване.

- Поставете в инкубация за **45 мин. на +37°C**.
- Измийте клетките, както е представено в раздел I.3.
- Поставете с капкомер 100 µL от сместа на субстрата TMB във всяка клетка, също и в празната. Изолирайте микроплочата на температури на помещението (18-24°C) за **15 минути**.

Важна забележка: Не излагайте на силна директна светлина. Може да бъде генериран висок фон.

- Поставете с капкомер 100 µL от блокиращия разтвор във всяко кладенче, като използвате същата последователност на поставяне на капки, описана в точка 10 за да спрете ензимната реакция. Добавянето на Блокиращ Разтвор ще промени позитивните проверки и положителните мостри от синьо до жълто.
- Измерете силата на цвета на разтвора във всяка клетка, както е описано в раздел 1.5, с един филтър за разчитане 450 nm и по възможност с един филтър 620-630 nm за операциите с празна клетка в позиция A1 на микроплоча.

Важни забележки:

- Ако вторият филтър не е на разположение, уверете се, че не са налични дигитални отпечатъци на дъното на микроплочата, преди разчитането на 450nm. Подобни отпечатъци биха могли да генерират фалшиви положителни резултати.
- Разчитането трябва да бъде извършено веднага след добавянето на Блокиращия Разтвор и при всички случаи, никога по-късно от 20 минути след това добавяне. Може да настъпи лека самоокисидация на субстрата и да доведе до резултат на високо дъно.
- Разбъркването на 350 ± 150 rpm по време на инкубация е показало, че чувствителността на дозиране се увеличава с около 20%.

N. СХЕМА НА АНАЛИЗ

Метод	Операции (Инкубация Стандартна)	Операции (Инкубация Кратка)
Проверки и Калибратор	200 µL	200 µL
Разтворител Мостри и Мостра	200 µL разтворител+ 10 µL мостра	200 µL разтворител+ 10 µL мостра
Разтворител за Анализ	50 µL	50 µL
1-ва инкубация	60 мин. (± 3)	45 мин. (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Измиване	4-5 цикъла	4-5 цикъла
Ензимен Конюгат	100 µL	100 µL
2-ра инкубация	30 мин. (± 1)	45 мин. (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Измиване	4-5 цикъла	4-5 цикъла
Субстрат TMB	100 µL	100 µL
3-та инкубация	30 мин. (± 1)	15 мин. (± 1)
Температура	Температура на помещението (18...24°C)	Температура на помещението (18...24°C)
Блокиращ	100 µL	100 µL
Разчитане OD	450/620nm	450/620nm

Един пример на схема на разпределяне е представен по-долу (валиден за двете процедури на инкубация):

Микроплоча

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Легенда: BLK = Бял NC = Отрицателна Проверка CAL = Калибратор PC = Положителна Проверка S = Мостра

O. ВЪТРЕШЕН КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

Една проверка на валидация се извършва на проверките и калибратора, всеки път, когато се използва комплекта, за да се провери дали характеристиките на анализа съответстват на стойностите на OD450/620nm както и на очакваните стойности и представени в следната таблица:

Проверка	Изисквания
Бял	< 0.100 OD 450/620nm стойност
Отрицателна Проверка (NC)	< 0.050 средна стойност OD450/620nm след насищане на празната клетка
Калибратор	S/Co >1.1
Позитивен Контрол	>1.000 OD450/620nm стойност

Ако резултатите от теста отговарят на изискванията, определени по-горе, пристъпете към следващия избор.

Ако не отговарят, не продължавайте и извършете следните проверки:

Проблеми	Проверка
Бял > 0.100 OD450nm	1. че разтворът на субстрата, не е замърсен по време на анализа
Отрицателна Проверка (NC) > 0.050 OD450nm след изваждане на празната клетка	1. че процедурата и настройките на устройството за измиване са валидирани според изследванията на преквалификация; 2. че е използван правилния разтвор за измиване и че устройството за измиване е било повредено преди употреба; 3. че не е допусната нито една грешка при процедурата на анализа (разпределяне на положителната проверка, вместо на отрицателната); 4. че не е настъпило никакво замърсяване на отрицателната проверка или на неговите клетки поради пръски на положителни мостри или на ензимен конюгат; 5. микро-капкомерите не са замърсени с положителни мостри или ензимен конюгат; 6. дали иглите на устройството за измиване не са блокирани или частично запушени.
Калибратор S/Co < 1.1	1. че процедурите са извършени правилно; 2. че не е допусната нито една грешка при дистрибуция (пр. дистрибуция на отрицателен контрол вместо на калибратор); 3. че процедурата и настройките на устройството за измиване са валидирани според изследванията на преквалификация; 4. че не е настъпило никакво външно замърсяване на калибратора.
Позитивен Контрол <1.000 OD450nm	1. че процедурите са извършени правилно; 2. че не е допусната нито една грешка при дистрибуция на проверката (дистрибуция на отрицателен контрол вместо положителен). В този случай, отрицателната проверка ще покаже един OD450nm > 0.150 3. че процедурата и настройките на устройството за измиване са валидирани според изследванията на преквалификация; 4. че не е настъпило никакво външно замърсяване на положителната проверка

Ако е настъпил някой от проблемите, представени по-горе, информирайте отговорника за допълнителни действия.

P. РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от теста са изчислени върху средната стойност на cut-off, определена със следната формула:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC среден} + 0.350$$

Намерената стойност за теста е използвана за резултатите, както е описано в следващия параграф.

Q. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Резултатите от теста са тълкувани, като съотношение между OD450nm на мострата и стойността Cut-Off (или S/Co) според следната таблица:

S/Co	Интерпретация
< 0.9	Отрицателно
0.9 - 1.1	Грешен
> 1.1	Позитивен

Един отрицателен резултат показва, че пациентът не е заразен от HCV или че кръвната проба може да бъде прелята.

Тези пациенти, които показват грешен резултат, трябва да бъдат тествани повторно, с една мостра, взета 1-2 седмици по-късно. Кръвната проба не трябва да бъде преливана.

Един положителен резултат показва наличието на инфекцията от HCV, следователно пациентът трябва в последствие да бъде лекуван и кръвната проба трябва да бъде отхвърлена.

Важни забележки:

- Интерпретацията на резултатите трябва да бъде извършена под наблюдението на отговорника на лабораторията, за да се намали риска от грешки при преценката.
- Всеки позитивен резултат трябва да бъде потвърден от един алтернативен метод, в състояние да открие антителата IgG и IgM (тест за потвърждение) преди да се даде една диагноза на вирусен хепатит.
- Както е показано в оценката на характеристиките на продукта, анализът е в състояние да отчете сероконверсията за антитела анти-HCV ядро, преди някои други комплекти от търговската мрежа. Следователно един положителен резултат, не потвърден, с тези търговски комплекти, не трябва да бъде изключен, като резултат фалшиво положителен! Мострата трябва да бъде при всички случаи да бъде подложен на един потвърдителен тест.
- В момента, в който анализът е в състояние да определи също така антитела от клас IgM, могат да бъдат открити различия с други търговски продукти за определянето на антитела анти HCV липси на конюгат анти IgM. Реалната положителност на мострата за антителата HCV трябва да бъде в последствие потвърдена, изследвайки също така реактивността IgM, важна за диагнозата на инфекцията HCV.
- Когато резултатите са предадени от една лаборатория на един информационен център, бъдете внимателно, за да не прехвърлите грешни данни.
- Диагнозата не трябва да бъде направена и съобщена на пациента, единствено от квалифициран медицински персонал.

Един пример на изчисление е представен в последствие:

Следните данни не трябва да бъдат използвани на мястото на реалните данни, използвани от потребителя.

Отрицателна Проверка: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Средна стойност: 0.020 OD450nm По-малко от 0.050 – Приет

Положителна Проверка: 2 189 OD450nm
По-висок от 1.000 – Приет

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370
 Калибратор: 0.550 - 0.530 OD450nm
 Средна стойност: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4
 S/Co по-висок от 1.1 – Прием

Мостра 1: 0 070 OD450nm
 Мостра 2: 1 690 OD450nm
 Мостра 1 S/Co < 0.9 = отрицателен
 Мостра 2 S/Co > 1.1 = положителен

R. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оценката на Характеристиките е проведена в съответствие с представеното в Common Technical Specifications или CTS (чл. 5, Раздел 3 на IVD Директива 98/79/EC) и на двете процедури на инкубация (стандартна и кратка).

1. ГРАНИЦА НА ОТЧИТАНЕ

Границата на отчитане на анализа е изчислена, използвайки процедурата на кратка инкубация посредством British Working Standard за анти-HCV, NIBSC код 06/188-006. Следващата таблица представя следните стойности OD450nm на стандартната, разредена в отрицателна плазма и след това изследвана.

Разреждане	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Фактор	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Отрицателна Плазма	0,25	0,20	0,20

Освен мострата с код Accurun 1 - серия 3000 – доставен от Boston Biomedica Inc., USA, е оценен "изцяло" показвайки следните резултати:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Фактор	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. ДИАГНОСТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ

Оценката на Характеристиките на устройството е извършена от един тест, проведен върху повече от 5000 мостри.

2.1 Диагностична Характеристика

Определена е като вероятност на анализа да бъде негативен, при липса на специфичен анализ. Изследвани са общо повече от 5000 случайни донори, включително даряващи за първи път. Диагностичната характеристика е била гарантирана срещу един одобрен комплект US FDA. 5043 дарители са били тествани, давайки една спецификация от 99.5%. 210 пациенти приети в болница, са били тествани за HCV; открита е диагностична специфичност 99.5%. Освен това, диагностичната характеристика е била доказана, тествайки 162 мостри, потенциално намесени (други заразни болести, положителни антитела E.coli, пациенти, страдащи от не вирусни чернодробни заболявания, пациенти на диализа, бременни жени, хемолизиран, липемични, и др.). Доказана е една стойност на специфичност 100%.

Не е наблюдавана никаква фалшива реактивност, дължаща се на метода на приготвяне на мострите. Като плазми, произхождащи от различните стандартни техники на подготовка (цитрат, EDTA и хепарин) и серумите, са били използвани за да се определят стойностите на специфичност. Тествани са замразените мостри, за да се проверят намесите, дължащи се на събирането и консервирането. Не е наблюдавано никакво взаимодействие.

2.2 Диагностична Чувствителност

Определена е като вероятност на анализа да бъде положителен, при липса на специфичен анализ. Диагностичната чувствителност е била потвърдена външно, върху един общ брой от 348 мостри; открита е една диагностична чувствителност от 100%. Вътрешно са били тествани повече от 50 положителни мостри, предоставяйки още една стойност на диагностична чувствителност 100%. Тествани са положителни мостри, от инфекции, провокирани от генотопи, различни от HCV.

Освен това са изследвани по-голямата част от панели за сероконверсия, доставени от Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) и Zeptometrix, USA, (HCV).

Резултатите за някои от тях са представени в последствие.

Панел	N° мостри	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Забележка:

1. Положителни Мостри
2. HCV v.3.0

Накрая, продуктът е бил тестван на панел EFS Ac HCV, партида n° 06.140817, доставен от Etablissement Francais Du Sang (EFS), Франция, със следните резултати:

Панел EFS Ac HCV

Мостра	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Резултати очаквани
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Отрицателно
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Позитивен
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Позитивен
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Позитивен
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Позитивен
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Позитивен

3. УТОЧНЕНИЕ

Изчислена е върху пет мостри, един отрицателен и четири положителни, изследвани в 4 повторения в четири отделни стартирания.

Резултатите са представени в последствие:

Резултати в рамките на партидата: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -

1^o Партида (кратка процедура на инкубация)

		Точност - %CV		
Мостра	S/Co Средна	Inter Анализ	Intra Анализ	Общо
Отрицателно	0.03	6.66	10.56	12.48
Положителни	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Резултати в рамките на партидата: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -

1^o Партида (дълга процедура на инкубация)

		Точност - %CV		
Мостра	S/Co Средна	Inter Анализ	Intra Анализ	Общо
Отрицателно	0.04	4.67	12.34	13.19
Положителни	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Резултати в партида: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -

1^o, 2^o и 3^o Партида (процедура кратка инкубация)

		Точност - %CV		
Мостра	Партида 1	Партида 2	Партида 3	
Отрицателно	8,65	8,29	6,13	
Калибратор	4,98	4,44	5,38	
Позитивен	4,11	3,11	1,37	

Променливостта, показана в таблиците, не е регистрирана в липса на класифициране на мострите.

S. ПРЕПОРЪКИ ЗА РЕШАВАНЕТО НА ПРОБЛЕМИ

Спазването на процедурата и на характеристиките, както и правилната употреба на реагентите и възможността на разпределянето, могат да предотвратят следните видове грешки:

ГРЕШКА	ВЪЗМОЖНИ ПРИЧИНИ / ПРЕПОРЪКИ
OD много различни ($\pm 50\%$) от тези, представени в QC	-грешен обем за разпространяване на реагенти (препоръка: проверете съответствието между обема, зададен в капкомерите и този, изискван от анализа, калибрирайте отново) -грешна температура или грешно време на инкубация (препоръка: най-стриктна поддръжка на инкубатора, да се отбележи началото на инкубацията) -грешка при извършване на измиванията и на фотометричното разчитане (препоръка: проверете функционирането или настройките на съответните инструменти) -замърсяване на Субстрата или на Конюгата (препоръка: използвайте само чисти пластмасови съдове за еднократна употреба)
Резултати слабо възпроизводими	-непостоянен обем на разпределяне на реагентите и на мострите (препоръка: проверете точността на капкомерите и съответствието между разпределяния обем и изискания от анализа; калибрирайте повторно) -грешка при извършване на измиванията или на разчитането (препоръка: проверете функционирането или настройките на съответните инструменти) -замърсяване на Субстрата (препоръка: използвайте само чисти пластмасови съдове за еднократна употреба) -замърсяване или деградация на реагентите (препоръка: използвайте подходящи игли, чисти пластмасови съдове за еднократна употреба и дестилирана вода или еквивалент)
Няма реакция в промяна на цвета след добавяне на Субстрата	-някои реагенти не са били разпространени -силно замърсяване на Конюгата или на Субстрата -грешно изпълнение на процедурата на анализа (пр. случайно разпределение на реагентите в една грешна последователност или от грешния съд, и др.)
Реакция прекалено разводнена (OD прекалено ниски)	-прекалено кратко време на инкубация, прекалено ниска температура на инкубация -грешно разреждане на конюгата
Реакция прекалено силна (OD прекалено високи)	-грешно разреждане на конюгата -време на инкубация прекалено дълго, температура на инкубация прекалено висока -лошо качество на използваната вода за разтвор за измиване (ниска степен на дейонизация) -недостатъчно измиване (конюгатите не са правилно отстранени)
Необясними резултати	-замърсяване на капкомерите, на върховете или на контейнерите -непрекъснато и недостатъчно измиване (конюгатите не са правилно отстранени)
CV% вътрешен анализ висок	-реагенти и/или не достигнали до температури на помещението преди употреба -устройството за измиване за микропличи не измива правилно (препоръка: почистете главата на устройството за измиване)
CV% интра-анализ висок	-непостоянни условия на инкубация (време, температура) -проверки и мостри, които не са разпределени в едно и също време (с едни и същи интервали) (проверете последователността на разпространяване) -присъща променливост на операторите

T. АВТОМАТИЗАЦИЯ

Процедурата, описана в тази инструкция за употреба е само за ръчно тестване. Когато се използват автоматични анализатори, е необходимо да се следват инструкциите, които са описани в ръководствата за употреба на самото устройство. Всяка лаборатория трябва да следва своите процеси за вътрешна валидация, демонстрирайки съвместимостта с автоматичните системи.

U. ОГРАНИЧЕНИЯ

повтарящи се фалшиви положителни резултати, непотвърдени от RIBA за потвърждение или подобни техники, са били оценени с по-малко от 0,1% от нормалното население.

Замразените мостри, съдържащи частици от фибрин или агрегати след размразяването, са показали като цяло фалшиви резултати.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human Tlymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.

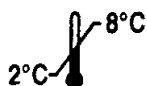
ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067  96

REF 071064  192

REF 071068  480



IVD

CE 0459

Lea atentamente este manual ilustrado antes de utilizar el producto y siga detalladamente las instrucciones contenidas en el mismo.

La fiabilidad de los resultados está garantizada solamente si se siguen atentamente las instrucciones.



Fabricante:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

es

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS

Español ES							
	Dispositivo Médico de Diagnóstico in Vitro	Número de Catálogo	Número de Lote	Atención, siga las Instrucciones de uso	Límites de Temperatura	Utilizar Antes de	Número de prueba
				MICROPLATE	CONTROL+	CONTROL-	CAL
	Fabricante	Proteja de la Luz Solar	Fecha de Fabricación	Microplaca	Control Positivo	Control Negativo	Calibrador
	CONJ	DILSPE	SUBSTMB	SOLNSTOP	WASHBUF20X	DILAS	RCNSx mL
	Conjugado	Diluyente Muestras	Substrato TMB	Solución Bloqueadora (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Tampón de Lavado Concentrado 20x	Diluyente del Ensayo	Reconstituir con x mL
	Riesgo Biológico	Peligro	Atención				

Atención:

Solución Bloqueadora clasificada como: Skin Corr. (Corrosivo para la Piel) 1A



- Advertencia:**
Peligro
- Componentes peligrosos que determinan el etiquetado:**
Ácido sulfúrico
- Indicaciones de peligro:**
H314 Provoca graves quemaduras cutáneas y graves lesiones oculares.
- Consejos de prudencia:**
P260 No respire el polvo/los humos/los gases/las nieblas/los vapores/ los aerosoles.
P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o con el pelo): quítese inmediatamente toda la vestimenta contaminada. Enjuague la piel/dúchese.
P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuague con agua delicadamente durante unos minutos. Quítese los lentes de contacto si es capaz de hacerlo. Continúe enjuagándose.
P310 Póngase en contacto inmediatamente con un CENTRO ANTIVENENOS o con un médico.
P405 Conserve bajo llave.
P501 Elimine el producto/recipiente en conformidad con los reglamentos locales/regionales/nacionales/internacionales

Atención:

Control Negativo, Control Positivo, Calibrador, Conjugado, Diluyente Muestras, Diluyente del Ensayo y Tampón de Lavado Concentrado 20X clasificados como: Skin Sens. (Sens. para la Piel) 1



- Advertencia:**
Atención
- Componentes peligrosos que determinan el etiquetado:**
Mezcla de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC nº 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC nº 220-239-6] (3:1)
- Indicaciones de peligro:**
H317 Puede provocar una reacción alérgica cutánea
- Consejos de prudencia:**
P261 Evite respirar el polvo/los humos/los gases/las nieblas/los vapores/ los aerosoles.
P280 Utilice guantes/vestimenta de protección/Proteja los ojos/el rostro.
P321 Tratamiento específico (véase en esta etiqueta).
P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: consulte con un médico.
P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lave con abundante agua.
P501 Elimine el producto/recipiente en conformidad con los reglamentos locales/regionales/nacionales/internacionales

Para las Fichas de Seguridad visite www.adaltis.net.

A. FINALIDADES DE USO

Dosificación Inmunoenzimática (ELISA) de cuarta generación para determinar los anticuerpos anti Virus de la Hepatitis C en plasmas (EDTA, Heparina y Citrato) y sueros humanos. El conjunto puede utilizarse para investigar los anticuerpos en las unidades de sangre de pacientes afectados por HVC.

Sólo para uso diagnóstico in vitro.

B. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Sanidad (OMS) define a la infección Hepatitis C del modo siguiente:

“La Hepatitis C es una infección viral del hígado que se le atribuye a la hepatitis “ni A ni B” transmitidas de forma parental hasta identificar el agente causante en el 1989. El descubrimiento y la caracterización del virus de Hepatitis C (HCV) lleva a comprender su papel primario en las hepatitis pos-transfusión y su tendencia para inducir infecciones persistentes”.

El HCV es una causa importante de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, incluida la cirrosis y el cáncer de hígado. A nivel mundial, se estima que 170 millones de personas están infectadas crónicamente con el VHC y de 3 a 4 millones de personas se infectan cada año. El HCV se transmite principalmente por contacto directo con sangre humana. Las mayores causas de HCV en el mundo son el uso de unidades de sangre no controlado para las transfusiones y la reutilización de agujas y jeringas no adecuadamente esterilizadas.

Actualmente no existe ninguna vacuna que prevenga la hepatitis C y el tratamiento de esta enfermedad crónica es demasiado costoso para que países en vías de desarrollo puedan permitírselo. Desde una perspectiva global, el más grande impacto en enfermos de hepatitis C se obtendrá enfocando los esfuerzos en reducir los riesgos de transmisión de HCV de exposiciones nosocomiales (transfusiones de sangre, inyecciones no seguras) y comportamientos de alto riesgo (inyección de drogas).

El virus de la hepatitis C (HCV) es uno de los virus (A, B, C, D, y E), responsables de la mayor parte de casos de hepatitis viral. Es un virus RNA que pertenece a la familia Flaviviridae que presenta un bajo espectro de huésped. Los humanos y los chimpancés son las especies susceptibles a infectarse y ambos desarrollan las mismas enfermedades. Una característica importante del virus es la correspondiente mutabilidad del genoma, que probablemente está relacionada con la alta tendencia (80%) en inducir infecciones crónicas. El HCV se encuentra en diferentes genotipos diferentes que pueden ser importantes para determinar la gravedad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

El periodo de incubación de la infección por HCV antes que inician los síntomas clínicos va de 15 a 150 días. En las infecciones agudas los síntomas más comunes son la fatiga e ictericia; de todos modos la mayor parte de los casos (entre el 60% y el 70%) son asintomáticos, incluso aquellos que desarrollan la infección crónica. Alrededor del 80% de los nuevos pacientes infectados desarrolla una infección crónica. Cirrosis la desarrolla alrededor del 10% al 20% que tienen una infección crónica, mientras que cáncer de hígado lo manifiesta entre el 1% y el 5% de las personas que tienen una infección crónica durante un periodo de 20 a 30 años. La mayor parte de pacientes que padecen cáncer de hígado que no

presentan infección de hepatitis B muestran infección por HCV. El mecanismo por el que la infección por HCV conduce al cáncer de hígado aún no es muy claro. La hepatitis C agrava la gravedad de las enfermedades de hígado cuando coexiste con otras condiciones hepáticas. Las enfermedades del hígado avanzan más rápidamente en personas con enfermedades hepáticas provocadas por el abuso de alcohol e infectadas con HCV. El HCV se transmite principalmente por contacto directo con sangre infectado. La transmisión a través de transfusiones de sangre no examinada para el HVC, la reutilización de agujas, jeringas y otros equipos médicos no adecuadamente esterilizados, o a través del intercambio de agujas entre drogodependientes está muy bien documentada. Menos frecuente es la transmisión por vía sexual o perinatal. Otros modos de transmisión están relacionados con prácticas comportamentales, sociales, culturales (body piercing, circuncisiones y tatuajes) y pueden producirse si se utilizan instrumentos no esterilizados correctamente. El HCV no se transmite a través de estornudos, abrazos, tos, alimentos o agua, compartiendo cubiertos o vasos ni por contacto casual.

Sea en países desarrollados que en aquellos en vías de desarrollo, grupos con alto riesgo incluyendo a usuarios de drogas inyectables, receptores de sangre no examinada, hemofílicos, dializados y personas con numerosos compañeros sexuales que practican relaciones sin protección. En los países desarrollados se estima que el 90% de las personas con infección de HCV crónica sean principalmente usuarios de drogas inyectables y aquellos con un historial de transfusiones de sangre no examinada o de hemoderivados. En la mayor parte de los países en vías de desarrollo, donde la sangre y los hemoderivados no examinados son aún utilizados, el medio principal de transmisión de la infección son instrumentos para inyecciones no esterilizados y transfusiones de sangre no controlada. Además las personas que practican sacrificios y circuncisiones están a riesgo si usan o reutilizan hierros sin esterilizar.

La OMS estima que alrededor de 170 millones de personas, el 3% de la población mundial está infectada por HCV y corren riesgo de desarrollar cirrosis y/o cáncer de hígado. La mayor parte de la infección HCV en África, Oriente Medio, Sudeste asiático y Pacífico occidental es alta si se compara con Norteamérica y Europa.

Las pruebas que diagnostican el HCV se utilizan para prevenir la infección a través del control de los donantes de sangre y plasma, para establecer el diagnóstico clínico y tomar mejores decisiones a la hora de curar un paciente. Actualmente las pruebas de diagnóstico se basan en dosis inmunoenzimáticas (EIA) para detectar anticuerpos específicos HCV. El sistema EIA puede detectar más del 95% de pacientes infectados crónicos pero solamente del 50% al 70% de las infecciones agudas. Un ensayo inmunoblot recombinante (RIBA) que identifica a los anticuerpos que actúan con antígenos individuales HCV a menudo se utiliza como una prueba complementaria para confirmar el resultado EIA positivo. Prueba para HCV basadas en la ampliación del RNA (p.ej PCR, ensayo ADN relacionado) también se han utilizado sea para confirmar el resultado serológico que para asignar una terapia antiviral eficaz. Un resultado positivo indica la presencia de infección activa y la

posibilidad de difusión de la infección y/o el desarrollo de enfermedades crónicas del hígado.

Los fármacos antivirales como el interferón asumido solo o junto a ribavirina, puede utilizarse para tratar personas con hepatitis C crónica, pero el coste del tratamiento es muy alto. El tratamiento con interferón solo es eficaz en alrededor el 10%-20% de los pacientes. El interferón combinado con ribavirina es eficaz en el 30%-50% de los pacientes. La ribavirina parece que no es eficaz cuando es utilizada sola.

No existe ninguna vacuna eficaz contra el HCV. La investigación procede pero la alta mutabilidad del genoma del HCV complica el desarrollo de una vacuna. La falta de conocimiento de respuestas inmuno-protectoras después de la infección por HCV impide investigar una vacuna. Tampoco se sabe si el sistema inmunitario es capaz de eliminar el virus.

Algunos estudios han mostrado la presencia de anticuerpos que neutralizan el virus en pacientes afectados por HCV. Al no existir una vacuna, se deben tomar todas las precauciones para prevenir la infección incluidas (a) screening y pruebas de sangre y órganos; (b) desactivación del virus en plasmas y productos derivados; (c) crecimiento y mantenimiento de prácticas de control de la infección en protocolos de atención sanitaria, como la esterilización adecuada de instrumentos médicos y dentales; (d) la promoción de cambios en los comportamientos entre la gente común y los operadores sanitarios para reducir el uso excesivo de inyecciones y practicar inyecciones seguras; (e) la reducción del riesgo para personas que usan drogas y realizan prácticas sexuales de alto riesgo.

El genoma codifica para los componentes estructurales, una proteína nucleocapsídica y glicoproteínas del envoltorio, y los constituyentes funcionales implicados en la replicación del virus y en el proceso de sus proteínas. La región codificadora nucleocapsídica parece ser la más conservadora entre los aislantes obtenidos en el mundo.

C. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Las microplacas se coaptan con antígenos HCV-específicos que derivan de las regiones "core" y "ns" codificadores para los antígenos inmunodominantes conservativos y determinantes (Core péptide, recombinante NS3, NS4 y NS5 péptidos).

Primero la fase sólida se trata con la muestra diluida y los anticuerpos HCV, si están presentes, son capturados por los antígenos. Después de haber lavado todos los componentes de la muestra, durante la segunda incubación legados los anticuerpos HCV, las IgG y las IgM se detectan al añadir anticuerpos policlonales específicos anti IgG&M, etiquetados con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada durante la fase sólida, al reaccionar con la mezcla sustrato TMB, genera una señal óptica que es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti HCV presentes en la muestra. Un valor de cut-off permite interpretar las densidades ópticas en resultados positivos y negativos en anticuerpos HCV.

D. COMPONENTES

El kit contiene reagentes para 96 tests (código 071067), 192 tests (código 071064), o 480 tests (código 071068).

Microplaca	1
Control Negativo	1x4 mL/frasco
Control Positivo	1x2 mL/frasco
Calibrador	2 frascos
Solución de Lavado conc. 20x	1x50 mL/frasco
Conjugado	1x16 mL/frasco
Diluyente de las Muestras	1x50 mL/frasco
Substrato TMB	1x16 mL/frasco
Solución Bloqueadora	1x15 mL/frasco
Diluyente del Ensayo	1x8 mL/frasco
Hoja cubreplaca	2
Número de los tests	96
Código	071067

Microplaca	2
Control Negativo	2x4 mL/frascos
Control Positivo	1x4 mL/frasco
Calibrador	3 frascos
Solución de Lavado conc. 20x	2x50 mL/frascos
Conjugado	2x16 mL/frascos
Diluyente de las Muestras	2x50 mL/frascos
Substrato TMB	2x16 mL/frascos
Solución Bloqueadora	2x15 mL/frascos
Diluyente del Ensayo	2x8 mL/frascos
Hoja cubreplaca	4
Número de los tests	192
Código	071064

Microplaca	5
Control Negativo	1x20 mL/frasco
Control Positivo	1x10 mL/frasco
Calibrador	7 frascos
Solución de Lavado conc. 20x	5x50 mL/frascos
Conjugado	2x40 mL/frascos
Diluyente de las Muestras	5x50 mL/frascos
Substrato TMB	2x40 mL/frascos
Solución Bloqueadora	2x40 mL/frascos
Diluyente del Ensayo	1x40 mL/frasco
Hoja cubreplaca	10
Número de los tests	480
Código	071068

1. Microplaca

12 tiras de 8 microceldas coaptadas con Core péptide, recombinante NS3, NS4 y NS5 péptidos. Las placas se sellan en una bolsa de aluminio con desecante.

Lleve la microplaca a temperatura ambiente (18...24°C) antes de abrir la bolsa. Vuelva a sellar las tiras que no se han utilizado en la bolsa con el desecante y conserve a 2...8°C.

2. Control Negativo

Control listo para usar. Contiene tampón Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1, 2% de caseína y 0.1% Proclin 150 como conservante. El control negativo está codificado con el color verde aceituna.

3. Control Positivo

Control listo para usar. Contiene el 1% de proteínas de suero de cabra, anticuerpos humanos positivos al HCV, tampón Na-citrato 10 mM a pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Azida de sodio y 0.1% Proclin 150 como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde oscuro.

Nota Importante: La ausencia de agentes patógenos vitales en el Control Positivo no puede estar completamente garantizada, y por lo tanto, el reagente tiene que ser tratado como potencialmente infectado, en conformidad con las buenas prácticas de laboratorio.

4. Calibrador

Calibrador liofilizado. Tiene que disolverse con un volumen de agua grado EIA que se muestra sobre la etiqueta. Contiene proteínas de suero bovino fetal, anticuerpos al HCV humanos cuyo contenido está calibrado en NIBSC Working Standard código 06/188-006, 10mM de tampón Citrato de sodio a pH 6.0±0.1, 0.3 mg/mL de gentamicina sulfato y 0.1% de Proclin 150 como conservantes.

Nota Importante: La ausencia de agentes patógenos vitales en el Calibrador no puede estar completamente garantizada, y por lo tanto, el reagente tiene que ser tratado como potencialmente infectado, en conformidad con las buenas prácticas de laboratorio.

Notas: el volumen necesario para diluir el contenido de la ampolla puede variar de lote en lote. Por favor, utilice el volumen correcto que se muestra en la etiqueta.

5. Solución de Lavado Concentrada 20x

Solución concentrada 20X. Una vez diluida, la solución de lavado (tampón de lavado diluido) contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 y 0.05% Proclin 150.

Una vez diluida la solución de lavado permanece estable durante 1 semana a 2...8°C.

6. Conjugado

Reagente listo para usar y codificado de color rojo. Contiene peroxidasa de rábano conjugada con anticuerpos policlonales de cabra a IgG y IgM humanas, 5% BSA, tampón Citrato 10 mM a pH 6.4 ± 0.1, 0.1% Proclin e 0.05% Tween 20 como conservantes.

7. Substrato TMB

Componente listo para usar. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido al 4%, 0.03% de tetrametilbenzidina (TMB) y 0.02% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Mezcle bien antes de usar.

Nota: Debe conservarse en un lugar protegido de la luz solar debido a la sensibilidad a la fuerte iluminación.

8. Diluyente del Ensayo

Componente listo para usar. Contiene suero de cabra, solución tamponada de Tris 10mM a pH 8.0±0.1 que contiene 0.1% de Proclin 150 y 0.09% Azida de sodio para el pretratamiento de las muestras y de los controles en la placa, bloqueando las interferencias.

9. Solución Bloqueadora

Componente listo para usar. Contiene una solución 0.3 M de H₂SO₄. Mezcle bien antes de usar.

10. Diluyente Muestra

Componente listo para usar y codificado de color verde oscuro. Contiene 1% de caseína, tampón Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1 y 0.1% Proclin 150 como conservante.

Utilice para diluir la muestra.

Nota: El diluyente cambia color de verde aceituna a verde azul oscuro en presencia de la muestra.

E. MATERIALES SOLICITADOS PERO NO ENTREGADOS

1. Micropipetas calibradas (200 µL y 10 µL) y puntas desechables.
2. Agua grado EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón activo para eliminar los oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Temporizador con intervalo de tiempo de 60 min o superior.
4. Hojas de papel absorbente.
5. Incubadora termostática calibrada para microplacas ELISA capaz de suministrar una temperatura de +37°C.
6. Lector calibrado de microceldas ELISA con lectura a 450nm posiblemente con filtros a 620-630nm para determinar el blanco.
7. Lavador calibrado de microplaca ELISA.
8. Vórtex o instrumentos similares para mezclar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El kit debe utilizarse solamente por personal técnico especializado y formado correctamente, bajo la supervisión del médico responsable del laboratorio. Lea atentamente este manual ilustrado antes de utilizar el producto y siga detalladamente las instrucciones contenidas en el mismo.
2. Lea atentamente la Ficha de Seguridad (SDS) antes de utilizar.
3. Cuando el kit se utiliza para el screening de unidades de sangre y componentes de la sangre, se tiene que utilizar en un laboratorio certificado y cualificado por la autoridad nacional en ese campo (Ministerio de la Sanidad o similares) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal implicado en la realización del ensayo tiene que utilizar vestimenta de protección de laboratorio, guantes de látex sin talco y gafas. Se tiene que evitar el uso de dispositivos apuntados (agujas) o cortante (hojas). Todo el personal implicado debería estar formado acerca de los procedimientos de seguridad personal, tal y como está recomendado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (EE.UU) y publicado en la publicación del Instituto Nacional de Sanidad: "Seguridad personal en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", ed. 1984.
5. Todo el personal implicado en manipular las muestras debería vacunarse para HBV y HAV, por lo que las vacunas disponibles son seguras y eficaces.
6. El ambiente de laboratorio debería estar controlado para evitar la contaminación de polvo y agentes microbiológicos en el aire, cuando se abren las ampollas y la microplaca del kit y cuando se realiza el test. Proteja el cromógeno/substrato TMB de la luz fuerte y evite vibraciones de la mesa de laboratorio una vez que el test se haya iniciado.
7. Desde el momento de la recepción, conserve el kit a 2...8°C en un frigorífico o cámara fría a temperatura controlada.
8. No intercambie los componentes entre los diferentes lotes del kit. Se recomienda no intercambiar los componentes de dos kits del mismo lote.
9. Controle que los reagentes sean limpios y no contengan grandes partículas o agregaciones. Si esto se produce alerte al supervisor del laboratorio para iniciar los procedimientos necesarios para sustituir el kit.

10. Evite contaminaciones cruzadas entre muestras de sueros/plasmas utilizando puntas desechables y cambiándolas después de cada muestra.
11. Evite contaminaciones cruzadas entre los reagentes del kit utilizando puntas desechables y cambiándolas para usar cada componente.
12. No utilice el kit después de la fecha de caducidad que aparece imprimida en el envase externo y sobre la etiqueta de cada ampolla en el interior.
13. Trate todas las muestras como potencialmente infectadas. Todos los sueros humanos deberían ser manipulados según el Nivel 2 de BioSeguridad, tal y como está recomendado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (EE.UU) junto con lo publicado por el Instituto de Sanidad: "BioSeguridad en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", ed. 1984.
14. El uso de contenedores de plástico desechables está recomendado para preparar componentes líquidos o para los componentes transferidos en ubicaciones automatizadas, para evitar contaminaciones cruzadas.
15. Los productos de desecho durante el uso del kit tiene que descargarse en conformidad con las directivas nacionales y las leyes sobre desechos de sustancias químicas y biológicas de laboratorio. En particular, los desechos líquidos generados del proceso de lavado, de avances de los controles y de las muestras deben tratarse como materiales potencialmente infectados e inactivados antes de ser eliminados. Se recomienda inactivar para el tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio al 10% unas 16-18 horas o desactivación en caliente en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
16. Los vuelcos accidentales de las muestras durante las operaciones deben absorberse con hojas de papel embebidas de hipoclorito de sodio y después enjuagados con agua. Después las hojas de papel deben eliminarse en un contenedor de desechos para materiales biológicos.
17. La Solución bloqueadora contiene ácido sulfúrico al 0.3 M. Evite el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto enjuague inmediatamente y con abundante agua.
18. Las soluciones reagentes que contienen Azida de sodio o Tiomersal como conservantes, tienen que tratarse siguiendo las disposiciones y las leyes en vigor en el País en las que se usa. La eliminación de soluciones que contienen Azida de sodio tiene previsto el uso de agua corriente en grandes cantidades. Preste atención al hecho que la Azida de sodio puede formar compuestos explosivos en caso de contacto prolongado con plomo y cobre.
19. No fume, no coma o aplique cosméticos en las zonas donde se manipulan las muestras y los reagentes.
20. Otros materiales de desecho generados por el uso del kit (por ejemplo: las puntas utilizadas para controles y muestras, microplacas usadas) deberían ser manipulados como potencialmente infectados y depositados en conformidad con las directivas nacionales y con las leyes relacionadas con la eliminación de desechos de laboratorio.
21. No pipetee con la boca.

G. MUESTRAS: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. La sangre ha sido extraída de forma aséptica por extracción en vena y los plasmas o sueros se han preparado utilizando las técnicas estándar de preparación de muestras para análisis clínicos de laboratorio. Ninguna influencia se ha observado durante la preparación de la muestra con citrato, EDTA o heparina.
2. Evite añadir conservantes a las muestras; especialmente ázida de sodio que puede influenciar la actividad enzimática del conjugado, generando resultados de falsos negativos.
3. Las muestras tienen que estar claramente identificadas con códigos o nombres para evitar confusiones a la hora de interpretar los resultados. Cuando el kit es utilizado para el screening de unidades de sangre se recomienda absolutamente etiquetar con códigos de barras de lectura electrónica.
4. Las muestras hemolizadas (rojas) y visiblemente hiperlipémicas (lechosas) tienen que ser desechadas ya que podrían generar falsos resultados. Las muestras que contienen restos de fibrina o grandes partículas o filamentos y cuerpos microbiológicos deberían desecharse ya que podrían originar resultados falsos.
5. Los sueros y plasmas pueden conservarse a +2...8°C hasta cinco días después de la extracción. Para conservar durante largos periodos, las muestras deben congelarse a -20°C durante varios meses. Cualquier muestra congelada no puede congelarse y descongelarse más de una vez ya que esto genera partículas que pueden influenciar el resultado del test.
6. Si se encuentran presentes partículas centrifugadas a 2.000 rpm durante 20 minutos o filtre con filtros a 0.2-0.8µm para limpiar la muestra que se desea probar.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y ADVERTENCIAS

Estudios realizados sobre un kit abierto no han mostrado ninguna pérdida de actividad importante hasta 1 reutilización del mismo material en 6 meses.

1. Microplacas:

Permita que la microplaca alcance la temperatura ambiente (al menos 1h) antes de abrir la bolsa. Controle que el desecante no se haya vuelto verde oscuro, indicando un defecto de conservación. En este caso llame al servicio de atención al cliente de Adaltis.

Las tiras que no se utilizan deben colocarse en un envase adecuado, en presencia del desecante incluido, bien selladas y conservadas a +2...8°C. Después de su primera apertura las tiras restantes son estables hasta que el indicador de humedad presente en el interior del envase del desecante cambia de amarillo a verde.

2. Control Negativo:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

3. Control Positivo:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar. Trate este componente como potencialmente infectado.

4. Calibrador:

Diluya atentamente el contenido liofilizado de la ampolla con el volumen de agua de grado EIA que se muestra en su etiqueta. Mezcle en un vórtex antes de usar.

Trate este componente como potencialmente infectado.

Nota: Una vez diluido el calibrador no es estable. Conserve en alícuotas a -20°C .

5. Solución de Lavado concentrada 20x:

(frasco de 50 mL):

Todo el contenido de la solución concentrada 20x tiene que ser diluido con agua bidestilada hasta 1000 ml (el volumen se muestra en la etiqueta) y mezclado bien antes de su uso. Desde el momento que la solución puede presentar formaciones cristalinas, preste atención de disolver todo el contenido. Evite generar espuma durante la preparación porque la presencia de burbujas puede disminuir la eficacia del lavado.

Nota: Una vez diluida la solución de lavado es estable durante 1 semana a $+2...8^{\circ}\text{C}$.

6. Conjugado:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar. Preste atención para no contaminar el líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios presentes en el aire. Si este componente tiene que transferirse use solamente contenedores de plástico posiblemente esterilizados.

7. Substrato TMB:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar. Preste atención para no contaminar el líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios presentes en el aire. No exponga a una fuerte iluminación, agentes oxidantes y superficies metálicas. Si este componente tiene que transferirse use solamente contenedores de plástico posiblemente esterilizados.

8. Diluyente del Ensayo:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

9. Solución Bloqueadora:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

10. Diluyente de la Muestra:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

I. INSTRUMENTACIÓN USADA JUNTO CON EL KIT

1. Las micropipetas deben calibrarse para emitir el correcto volumen necesario para el ensayo y tienen que someterse a una descontaminación regular (alcohol desnaturalizado, lejía al 10%, solución desinfectante hospitalaria) de aquellas partes que podrían entrar en contacto de modo accidental con la muestra. Estas deberían controlarse para mostrar una precisión del 1% y una corrección de $\pm 2\%$. La descontaminación de pulverizaciones o restos de componentes del kit debería realizarse de forma regular.
2. La incubadora ELISA debería calibrarse a 37°C (tolerancia de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y controlarse de forma regular para asegurar el mantenimiento de la temperatura correcta. Ambas incubadoras en seco y con baños de agua pueden utilizarse para la incubación si los instrumentos están convalidados para incubar tests ELISA.

3. El lavador ELISA es extremadamente importante para que el resultado del ensayo sea positivo. El lavador tiene que ser convalidado atentamente y correctamente optimizado. Normalmente son suficientes 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensación de $350\text{ }\mu\text{L}$ de solución lavado = 1 ciclo) para asegurar que el ensayo del resultado esperado. Se recomienda un intervalo de soaking de 20-30 segundos entre los ciclos. Para establecer correctamente su número, se recomienda realizar un test de prueba con los controles del kit y muestras de referencia bien caracterizadas como positivos o negativos, y controlar la correspondencia con los valores que se muestran debajo de la sección O "Control de calidad interno". La calibración regular del volumen suministrado y el mantenimiento del lavador (descontaminación y limpieza de las agujas) debe realizarse siguiendo las indicaciones del fabricante.

4. Los tiempos de incubación tienen una tolerancia de $\pm 5\%$.

- ✓ Método de Incubación Breve (para la $1^{\text{a}}/2^{\text{a}}$ incubación la tolerancia está comprendida entre 43 min. y 47 min.; para la 3^{a} incubación la tolerancia está comprendida entre 14 y 16 min.).
- ✓ Método de Incubación Estándar (para la 1^{a} incubación la tolerancia está comprendida entre 57 min. y 63 min.; para la 2^{a} y 3^{a} incubación la tolerancia está comprendida entre 29 y 31 min.).

5. El lector de microplacas ELISA tiene que estar compuesto por un filtro de lectura de 450nm y por un segundo filtro ($620\text{-}630\text{nm}$) para las operaciones del blanco. Sus prestaciones estándar deberían ser (a) amplitud de banda $\leq 10\text{nm}$; (b) intervalo de absorción de 0 a ≥ 2.0 ; (c) linealidad ≥ 2.0 ; (d) repetibilidad $\geq 1\%$. El blanco está determinado según las instrucciones contenidas en la sección "Procedimiento del Ensayo". El sistema óptico del lector tiene que ser calibrado de forma regular para asegurar la medición correcta de la densidad óptica. El mantenimiento debería realizarse con regularidad en conformidad con las instrucciones del fabricante.

6. Cuando se usa una estación de trabajo automatizada para el kit ELISA, todos los pasos críticos (dispensación, incubación, lavado, lectura, manipulación de datos) tienen que ser atentamente controlados, calibrados, y regularmente guardados para conservar la correspondencia con los valores que se muestran en las secciones O "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo se debe instalar en el sistema operativo de la unidad y convalidado al igual que el lavador y el lector. Además, la parte de la estación que manipula los componentes líquidos (dispensación y lavado) tiene que ser convalidada y correctamente configurada. Se debe prestar particular atención para evitar el arrastre por parte de las agujas usadas para la dispensación y el lavado. Esto debe ser estudiado y controlado para minimizar la posibilidad de contaminación de las celdas adyacentes. El uso de estaciones de trabajo automatizadas ELISA está recomendado para el screening de sangre cuando el número de muestras que se desea probar es mayor a 20-30 por recorrido de la máquina.

L. CONTROLES Y OPERACIONES PRE ENSAYO

1. Controle la fecha de caducidad del kit, está imprimida en la etiqueta externa de la caja. No utilice el kit si está caducado.

2. Controle que los componentes líquidos no estén contaminados por partículas o agregados visibles a la vista. Controle que el Substrato TMB sea incoloro o azul pálido aspirando un pequeño volumen del mismo con una pipeta de plástico estéril transparente. Controle que el envase no presenta daños durante el transporte y de consecuencia, ninguna pérdida de líquido esté presente en el interior de la caja. Controle que el envase de aluminio, que contiene la microplaca, no esté perforada o dañada.
3. Diluya todo el contenido de la Solución de Lavado concentrada 20x como se describe en la parte de arriba.
4. Diluya el calibrador como se describe en la parte de arriba.
5. Permita a todos los componentes del kit alcanzar la temperatura ambiente (alrededor de 1 h) y después mezclar como se ha descrito.
6. Siguiendo las instrucciones del fabricante, configure la incubadora ELISA a +37°C y prepare el lavador ELISA acercándolo con la solución de lavado diluida. Configure el número correcto de ciclos de lavado como se muestra en la sección I.3.
7. Controle que el lector ELISA esté encendido desde hace al menos 20 minutos antes de la lectura.
8. Si se utiliza una estación de trabajo automatizada, enciéndala, controle las configuraciones y asegúrese de utilizar el protocolo correcto.
9. Controle que las micropipetas estén configuradas al volumen necesario.
10. Controle que todos los instrumentos estén disponibles y listo para ser utilizados.
11. En caso de problemas no continúe realizando el test e informe al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo tiene que ser utilizado en conformidad con lo que se indica a continuación, prestando atención de mantener la misma incubación para todas las muestras para probar.

El ensayo puede ser realizado a través de dos procedimientos de incubación. Seleccione aquella más adecuada para su reglamentación:

1. Incubación Estándar (1ª incubación 60 minutos, 2ª y 3ª incubación 30 minutos)
2. Incubación Breve (1ª y 2ª incubación 45 minutos, 3ª incubación 15 minutos)

1. Incubación Estándar - Ensayo Manual:

1. Introduzca el número correcto de micropocillos en el correspondiente soporte. Deje la primera celda vacía para las operaciones del blanco.
2. Dispense 200 µL de Control Negativo en triple, 200 µL de Calibrador en doble y 200 µL de Control Positivo individual en las celdas adecuadas. ¡No diluya Controles y Calibrador porque ya han sido prediluidos y están listos para su uso!
3. Añada 200 µL de Diluyente de Muestras a todas las celdas de las muestras; después dispense 10 µL de muestra en cada celda adecuadamente identificada. Agite bien la placa, evitando desbordamientos y contaminaciones de las celdas adyacentes, para diluir por completo la muestra en su diluyente.

Nota importante: Controle que el color del Diluyente de la Muestra, después de haber añadido la muestra, cambie de verde claro a verde azulado oscuro, indicando que la muestra ha sido añadida.

4. Dispense 50 µL de Diluyente del Ensayo en todas las celdas de controles/calibrador y de las muestras. Controle que el color de las muestras cambie a azul oscuro.
5. Incube la microplaca unos **60 min a +37°C**.
Nota Importante: Solamente cuando el test sea realizado manualmente las tiras tienen que cubrirse con una hoja adhesiva adecuada incluida en el envase. No cubra las tiras cuando se usa un instrumento ELISA automatizado.
6. Lave la microplaca con un lavador automático soltando y aspirando 350 µL/celda de solución de lavado diluida como se muestra en la sección I.3.
7. Pipetee 100 µL de Conjugado Enzimático en todas las celdas excepto en la de blanco, y recubra con la hoja adhesiva. Controle que este componente de color rojo haya sido dispensado en todas las celdas excepto en la A1.

Nota Importante: Atención de no golpear la superficie del plástico interno de la celda con la punta llena de Conjugado. Pueden producirse contaminaciones.

8. Incube la microplaca unos **30 min a +37°C**.
9. Lave las celdas como se muestra en la sección I.3.
10. Pipetee 100 µL de mezcla Substrato TMB en cada celda incluso en aquella del blanco. Incube la microplaca a temperatura ambiente (18-24°C) **durante 30 minutos**.

Nota Importante: No exponga a una fuerte iluminación directa. Puede determinar fondos altos.

11. Pipetee 100 µL de Solución Bloqueadora en cada celda utilizando la misma secuencia de pipeteado que se describe en el punto 10 para detener la reacción enzimática. El añadido de Solución Bloqueadora hará cambiar el control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Mida la intensidad de color de la solución en cada celda, como se describe en la sección 1.5, con un filtro de lectura a 450 nm y posiblemente con un filtro a 620-630nm para las operaciones del blanco en posición A1 de la microplaca.

Notas importantes:

1. Si el segundo filtro no está disponible asegúrese que no se encuentren presentes huellas digitales en el fondo de la microplaca antes de lectura a 450nm. Tales huellas podrían generar falsos positivos.
2. La lectura debe ser realizada inmediatamente después de añadir la Solución Bloqueadora y nunca más de 20 minutos después de tal añadido. Puede producirse una ligera auto-oxidación del substrato y conducir a un resultado de fondo alto.
3. La agitación a 350 ± 150 rpm durante la incubación ha demostrado que la sensibilidad de la dosificación aumenta alrededor del 20%.

2. Incubación Breve - Ensayo Manual:

1. Introduzca el número correcto de micropocillos en el correspondiente soporte. Deje la primera celda vacía para las operaciones del blanco.
2. Dispense 200 µL de Control Negativo en triple, 200 µL de Calibrador en doble y 200 µL de Control

Positivo individual en las celdas adecuadas. ¡No diluya Controles y Calibrador porque ya han sido prediluidos y están listos para su uso!

- Añada 200 µL de Diluyente de Muestras a todas las celdas de las muestras; después dispense 10 µL de muestra en cada celda adecuadamente identificada. Agite bien la placa, evitando desbordamientos y contaminaciones de las celdas adyacentes, para diluir por completo la muestra en su diluyente.

Nota importante: Controle que el color del Diluyente de la Muestra, después de haber añadido la muestra, cambie de verde claro a verde azulado oscuro, indicando que la muestra ha sido añadida.

- Dispense 50 µL de Diluyente del Ensayo en todas las celdas de controles/calibrador y de las muestras. Controle que el color de las muestras cambie a azul oscuro.
- Incube la microplaca unos **45 min a +37°C**.
Nota Importante: Solamente cuando el test sea realizado manualmente las tiras tienen que cubrirse con una hoja adhesiva adecuada incluida en el envase. No cubra las tiras cuando se usa un instrumento ELISA automatizado.
- Lave la microplaca con un lavador automático soltando y aspirando 350 µL/celda de solución de lavado diluida como se muestra en la sección I.3.
- Pipetee 100 µL de Conjugado Enzimático en todas las celdas excepto en la de blanco, y recubra con la hoja adhesiva. Controle que este componente de color rojo haya sido dispensado en todas las celdas excepto en la A1.

Nota importante: Atención de no golpear la superficie del plástico interno de la celda con la punta llena de conjugado. Pueden producirse contaminaciones.

- Incube la microplaca unos **45 min a +37°C**.
- Lave las celdas como se muestra en la sección I.3.
- Pipetee 100 µL de mezcla Substrato TMB en cada celda incluso en aquella del blanco. Incube la microplaca a temperaturas ambiente (18-24°C) durante **15 minutos**.

Nota importante: No exponga a una fuerte iluminación directa. Puede determinar fondos altos.

- Pipetee 100 µL de Solución Bloqueadora en cada celda utilizando la misma secuencia de pipeteado que se describe en el punto 10 para detener la reacción enzimática. El añadido de Solución Bloqueadora hará cambiar el control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
- Mida la intensidad de color de la solución en cada celda, como se describe en la sección 1.5, con un filtro de lectura a 450 nm y posiblemente con un filtro a 620-630nm para las operaciones del blanco en posición A1 de la microplaca.

Notas importantes:

- Si el segundo filtro no está disponible asegúrese que no se encuentren presentes huellas digitales en el fondo de la microplaca antes de lectura a 450nm. Tales huellas podrían generar falsos positivos.
- La lectura debe ser realizada inmediatamente después de añadir la Solución Bloqueadora y nunca más de 20 minutos después de tal añadido. Puede

producirse una ligera auto-oxidación del sustrato y conducir a un resultado de fondo alto.

- La agitación a 350 ± 150 rpm durante la incubación ha demostrado que la sensibilidad de la dosificación aumenta alrededor del 20%.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones (Incubación Estándar)	Operaciones (Incubación Breve)
Controles & Calibrador	200 µL	200 µL
Diluyente Muestras y Muestra	200 µL diluyente+ 10 µL muestra	200 µL diluyente+ 10 µL muestra
Diluyente del Ensayo	50 µL	50 µL
1ª incubación	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavado	4-5 ciclos	4-5 ciclos
Conjugado Enzimático	100 µL	100 µL
2ª incubación	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavado	4-5 ciclos	4-5 ciclos
Substrato TMB	100 µL	100 µL
3ª incubación	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatura	Temperatura ambiente (18...24°C)	Temperatura ambiente (18...24°C)
Solución Bloqueadora	100 µL	100 µL
Lectura OD	450/620nm	450/620nm

Un ejemplo de esquema de dispensación se muestra debajo (válido para ambos procedimientos de incubación):

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Leyenda: BLK = Blanco NC = Control Negativo
CAL = Calibrador PC = Control Positivo S = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Un control de validación está realizado en los controles y el calibrador cada vez que el kit es utilizado para verificar que las prestaciones del ensayo son conformes sea con los valores OD450/620nm que con los valores esperados y que se muestran en la tabla siguiente:

Control	Requisitos
Pozo en Blanco	< 0.100 OD 450/620nm valor
Control Negativo (NC)	< 0.050 valor medio OD450/620nm después de sustraer el blanco
Calibrador	S/Co >1.1
Control Positivo	>1.000 OD450/620nm valor

Si los resultados del test se corresponde con los requisitos establecidos arriba, pase a la próxima sección.

Si no se corresponden, no pase el paso siguiente y realice los controles siguientes:

Problemas	Control
Pozo en Blanco > 0.100 OD450nm	1. que la solución Substrato no se haya contaminado durante el ensayo
Control Negativo (NC) > 0.050 OD450nm después de sustraer el blanco	1. que el procedimiento de lavado y las configuraciones del lavador sean validadas según los estudios de pre cualificación; 2. que se haya utilizado la solución correcta de lavado y que el lavador se haya puesto en funcionamiento antes de su uso; 3. que ningún error haya sido cometido durante el procedimiento del ensayo (dispensación del control positivo en lugar del negativo); 4. que no se haya producido ninguna contaminación del control negativo o de sus celdas a causa de salpicaduras de las muestras positivas o del conjugado enzimático; 5. que las micropipetas no estén contaminadas con muestras positivas o conjugado enzimático; 6. que las agujas del lavador no estén bloqueadas o parcialmente obstruidas.
Calibrador S/Co < 1.1	1. que los procedimientos hayan sido realizados correctamente; 2. que ningún error se haya producido durante su distribución (p. ej. dispensación del control negativo en lugar del calibrador); 3. que el procedimiento de lavado y las configuraciones del lavador sean validadas según los estudios de pre cualificación; 4. que no se haya producido ninguna contaminación externa del calibrador.
Control Positivo <1.000 OD450nm	1. que los procedimientos hayan sido realizados correctamente; 2. que ningún error haya sido cometido en la distribución del control (dispensación del control negativo en lugar del positivo); En este caso el control negativo mostrará un OD450nm > 0.150 3. que el procedimiento de lavado y las configuraciones del lavador sean validadas según los estudios de pre cualificación; 4. que no se haya producido ninguna contaminación externa del control positivo.

Si se ha verificado alguno de los problemas citados anteriormente, informe al supervisor para otras acciones.

P. RESULTADOS

Los resultados del test están calculados basándose en la media de un valor de cut-off determinado con la fórmula siguiente:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC medio} + 0.350$$

El valor hallado para el test es utilizado para interpretar los resultados como se describe en el apartado siguiente.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del test están interpretados como la relación entre el OD450nm de la muestra y el valor del Cut-Off (o S/Co) en conformidad con la tabla siguiente:

S/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HCV o que la unidad de sangre puede ser sometida a transfusión.

Aquellos pacientes que muestran un resultado equívoco deberían probarse nuevamente sobre una muestra extraída 1-2 semanas después. La unidad de sangre no debería ser sometida a transfusión.

Un resultado positivo indica la presencia de la infección por HCV, por lo que el paciente debería ser tratado de consecuencia y la unidad de sangre descartada.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debería ser realizada bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio.
2. Cualquier resultado positivo debería confirmarse por un método alternativo capaz de detectar los anticuerpos IgG e IgM (test de confirmación) antes de formular un diagnóstico de hepatitis viral.
3. Como se ha demostrado en la valoración de las prestaciones del producto, el análisis es capaz de detectar la seroconversión por anticuerpos anti-HCV core antes de otros kit que se encuentran en el comercio. ¡Por lo tanto un resultado positivo, no confirmado, con estos kit comerciales no tiene que ser excluido como un resultado falso positivo! La muestra tiene que ser sometida a un test de confirmación.
4. Desde el momento que el ensayo es capaz de determinar incluso anticuerpos de clase IgM, podrían detectarse discrepancias con otros productos comerciales para determinar anticuerpos anti HCV sin conjugado anti IgM. La positividad real de la muestra para los anticuerpos HCV debería confirmarse examinando también la reactividad IgM, importante para diagnosticar la infección HCV.
5. Cuando los resultados son comunicados del laboratorio a un centro informático, preste atención para no transferir datos incorrectos.
6. El diagnóstico de hepatitis viral debe realizarse y comunicarse al paciente solamente por parte de personal médico cualificado.

A continuación se muestra un ejemplo de cálculo:

Los datos siguientes no deben utilizarse en lugar de los datos reales obtenidos por el usuario:

Control Negativo: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Valor Medio: 0.020 OD450nm Menor de 0.050 – Aceptado

Control Positivo: 2.189 OD450nm

Más alto que 1.000 – Aceptado

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370

Calibrador: 0.550 - 0.530 OD450nm

Valor Medio: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4
S/Co más alto que 1.1 – Aceptado

Muestra 1: 0.070 OD450nm

Muestra 2: 1.690 OD450nm

Muestra 1 S/Co < 0.9 = negativo

Muestra 2 S/Co < 1.1 = positivo

R. RENDIMIENTO

La Valoración del Rendimiento ha sido conducido en conformidad con lo citado en las Common Technical Specifications o CT (art.5, Capítulo 3 de IVD Directiva 98/79/EC) y a ambos procedimientos de incubación (estándar y breve).

1. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección del ensayo ha sido calculado utilizando el procedimiento de incubación breve por medio del British Working Standard para anti-HCV, NIBSC código 06/188-006. La tabla siguiente muestra los valores medios de OD450nm de este estándar diluido en plasma negativo y después examinado.

Dilución	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Plasma Negativo	0,25	0,20	0,20

Además la muestra codificada Accurun 1 - series 3000 – entregada por Boston Biomedica Inc., USA, ha sido valorada “en su totalidad” mostrando los resultados siguientes:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA Y SENSIBILIDAD

La Valoración del Rendimiento del dispositivo ha sido conducida en una prueba externa conducida en más de 5.000 muestras.

2.1 Especificidad Diagnóstica

Está definida como la probabilidad del ensayo de indicar negativo en ausencia de un análisis específico. Se han examinado un total de más de 5.000 donantes, incluidos donantes primerizos.

La especificidad diagnóstica es constatada contra un kit aprobado US FDA.

Se han examinado 5.043 donantes suministrando una especificidad del 99.5%.

Se han examinado 210 pacientes hospitalizados para HCV; y se ha detectado una especificidad diagnóstica del 99.5%. Además, la especificidad diagnóstica es comprobada examinando 162 muestras potencialmente interferentes (otras enfermedades infecciosas, anticuerpos positivos E.coli, pacientes con enfermedades hepáticas no virales, pacientes con diálisis, mujeres embarazadas, hemolizados, lipémicos, etc.). Se ha diagnosticado un valor de especificidad del 100%.

No se ha observado ninguna falsa reactividad debida al método de preparación de muestras. Sea los plasmas,

derivados con diferentes técnicas estándar de preparación (citrato, EDTA y heparina), y sueros se han utilizado para determinar los valores de especificidad. Se han examinado muestras congeladas, para comprobar interferencias debidas a la cosecha y conservación. No se ha observado ninguna interferencia.

2.2 Sensibilidad Diagnóstica

Está definida como la probabilidad del ensayo de indicar positivo en ausencia de un análisis específico. La sensibilidad diagnóstica ha sido asegurada externamente sobre un número total de 348 muestras; una sensibilidad diagnóstica del 100% ha sido detectada. Internamente se han probado más de 50 muestras positivas, suministrando todavía un valor de sensibilidad diagnóstica del 100%.

Se han probado muestras positivas por infecciones provocadas por genotipos diferentes de HCV.

Además se ha estudiado la mayor parte de los paneles de seroconversión suministrados por Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) y Zeptometrix, USA, (HCV).

A continuación se muestran los resultados para algunos de ellos.

Panel	Nº muestras	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Nota:

1. Muestras Positivas detectadas

2. HCV v.3.0

Por último el producto ha sido probado en el panel EFS Ac HCV, lot nº 06.140817, suministrado por Etablissement Francais Du Sang (EFS), Francia, con los resultados siguientes:

Panel EFS Ac HCV				
Muestra	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Resultados esperados
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativo
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positivo
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positivo
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positivo
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positivo
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positivo

3. PRECISION

Se ha calculado en cinco muestras, una negativa y cuatro positivas, examinadas en 4 repeticiones en seis run separadas.

Los resultados se muestran a continuación:

Resultados intra-lote: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1º Lote (procedimiento de incubación breve)

		Precisión - %CV		
Muestra	S/Co Media	Inter Ensayo	Intra Ensayo	Total
Negativo	0.03	6.66	10.56	12.48
Positivos	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Resultados intra-lote: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1º Lote (procedimiento de incubación largo)

		Precisión - %CV		
Muestra	S/Co Media	Inter Ensayo	Intra-Ensayo	Total
Negativo	0.04	4.67	12.34	13.19
Positivos	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Resultados inter-lote: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1º, 2º y 3º Lote (procedimiento incubación breve)

		Precisión - %CV		
Muestra	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
Negativo	8.65	8.29	6.13	
Calibrador	4.98	4.44	5.38	
Positivo	4.11	3.11	1.37	

La variabilidad mostrada en las tablas no ha resultado en la clasificación errónea de las muestras.

S. SUGERENCIAS PARA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

La adhesión al procedimiento y a las especificaciones, así como el uso correcto de los reagentes y la dispensación adecuada, pueden evitar los tipos de error siguientes:

ERROR	POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS
OD muy diferentes ($\pm 50\%$) de aquellas que se muestran en el QC	-volumen incorrecto de dispensación de los reagentes (sugerencia: controle la correspondencia entre el volumen configurado en las pipetas y aquel requerido por el ensayo, calibrarlas nuevamente) -temperatura incorrecta o tiempo de incubación incorrecto (sugerencia: mantenimiento más detallado de la incubadora, anote el inicio de la incubación) -error en la realización de los lavados y en la lectura fotométrica (sugerencia: controle el funcionamiento o las configuraciones de los correspondientes instrumentos) -contaminación del Substrato o del Conjugado (sugerencia: utilice solamente contenedores de plástico desechable limpios)

Resultados poco reproducibles	-volumen de dispensación de los reagentes y de las muestras no constante (sugerencia: controle la precisión de las pipetas y la correspondencia entre el volumen dispensado y aquel necesario para el ensayo; calibrarlas nuevamente) -error en la realización de los lavados o de la lectura (sugerencia: controle el funcionamiento o las configuraciones de los correspondientes instrumentos) -contaminación del Substrato (sugerencia: utilice solamente contenedores de plástico desechable limpios) -contaminación o degradación de los reagentes (sugerencia: utilice puntas adecuadas, contenedores de plástico desechable y agua destinada o equivalente)
Ninguna reacción colorimétrica después de añadir el Substrato	-algunos reagentes no han sido dispensados -fuerte contaminación del Conjugado o del Substrato -realización errónea del procedimiento del ensayo (p. ej dispensación accidental de los reagentes en una secuencia incorrecta o por el contenedor incorrecto, etc.)
Reacción demasiado blanca (OD demasiado bajas)	-tiempo de incubación demasiado breve, temperatura de incubación demasiado baja -dilución del conjugado errónea
Reacción demasiado intensa (OD demasiado altas)	-dilución del conjugado errónea -tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta -calidad decadente del agua utilizada para la solución de lavado (bajo grado de desionización) -lavado insuficiente (conjugados no eliminados correctamente)
Resultados inexplicables	-contaminación de las pipetas, de las puntas o de los contenedores -lavado inconstante e insuficiente (conjugados no eliminados correctamente)
CV% interensayo elevado	-reagentes y/o no llevadas a temperaturas ambientes antes de usar - el lavador para microplacas no lava correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)
CV% intraensayo elevado	-condiciones de incubación no constantes (tiempo, temperatura) -controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con mismos intervalos) (controle la secuencia de dispensación) -variabilidad intrínseca de los operadores

T. AUTOMACIÓN

El proceso que se describe en estas instrucciones de uso es solamente para el test en manual. Cuando se utilizan analizadores automáticos, es necesario seguir las instrucciones que se describen en los manuales de uso del mismo dispositivo. Todo laboratorio debe seguir sus propios procesos de validación interna demostrando la compatibilidad con los sistemas automáticos.

U. LIMITACIONES

Repetibles resultados falsos positivos, no confirmados por el RIBA de confirmación o técnicas similares, se han valorado como inferiores al 0,1% de la población normal. Las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados después del descongelación han mostrado generar falsos positivos.

BIBLIOGRAFIA

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhuth MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JL, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore—an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretsch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

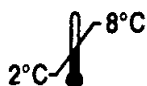
Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Lire attentivement cette notice avant d'utiliser le produit et suivre les instructions.

La fiabilité des résultats d'analyse ne peut pas être garantie si ces instructions ne sont pas strictement respectées.



Fabriqué par :

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

www.adaltis.net

fr

SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES

Français FR							
	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Référence catalogue	Numéro de Lot	Attention : lire les Instructions avant l'Utilisation	Limites de température	Date de péremption	Nombre de tests
	Fabriqué par...	Ne pas exposer à la lumière	Date de fabrication	Microplaque	Contrôle positif	Contrôle négatif	Calibrateur
	Conjugué	Diluant pour échantillon	Substrat TMB	Solution d'Arrêt (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Solution de Lavage Concentré 20x	Diluant dd'analyse	A Reconstituer avec x mL
	Risque biologique	Danger	Attention				

Attention:

Solution d'Arrêt classée Skin Corr. 1A



- **Mention d'avertissement:**
Danger
- **Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage:**
Acide sulfurique
- **Mentions de danger:**
H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
- **Conseils de prudence:**
P260 Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P303+P361+P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés.
Rincer la peau à l'eau/Se doucher.
P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P310 Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.
P405 Garder sous clef.
P501 Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Attention :

Contrôle Négatif, Contrôle Positif, Calibrateur, Conjugué, Diluant pour échantillon, Diluant de dosage et Solution de Lavage Concentré 20x classé comme : Skin Sens. 1



- **Mention d'avertissement:**
Attention
- **Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage:**
mélange de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- **Mention de danger:**
H317 Peut provoquer une allergie cutanée.
- **Conseils de prudence:**
P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P321 Traitement spécifique (voir sur cette étiquette).
P333+P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.
P302+P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau.
P501 Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Pour les Fiches de Données de Sécurité, consulter www.adaltis.net.

A. UTILISATION

Quatrième génération de dosage immuno-enzymatique (ELISA) pour la détermination d'anticorps contre le virus de l'hépatite C dans le plasma humain (EDTA, héparine et citrate) et des sérums. Le kit peut être utilisé pour le criblage d'unités de sang de patients contaminés par le HCV.

Pour diagnostic in vitro uniquement.

B. INTRODUCTION

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) définit l'hépatite C comme suit:

« L'hépatite C est une infection virale du foie qui avait été désignée comme transmise par voie parentérale » non A, non de l'hépatite B » jusqu'à l'identification de l'agent causal en 1989. La découverte et la caractérisation du virus de l'hépatite C (HCV) ont conduit à la compréhension de son rôle primordial dans la post-hépatite transfusionnelle et de sa tendance à provoquer une infection persistante.

Le HCV est la principale cause de l'hépatite aiguë et de maladie chronique du foie comprenant la cirrhose et le cancer. Globalement, on estime que 170 millions de personnes sont chroniquement contaminées par le HCV et que 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année. Le HCV se transmet principalement par contact direct avec du sang humain. Les principales causes de l'infection par le HCV dans le monde sont la transfusion de sang non contrôlé, et la réutilisation de seringues et d'aiguilles non stérilisées adéquatement. Aucun vaccin n'est actuellement disponible pour prévenir l'hépatite C et le traitement de l'hépatite chronique C est trop coûteux pour la plupart des personnes dans les pays en voie de développement. Ainsi, d'un point de vue global, le plus grand impact sur la charge de morbidité de l'hépatite C sera probablement atteint en concentrant les efforts sur la réduction du risque de transmission du HCV d'expositions nosocomiales (par exemple, les transfusions sanguines, les pratiques d'injection à risque) et les comportements à haut risque (utilisation de drogues injectables par exemple).

L'hépatite C (HCV) est l'un des virus (A, B, C, D et E), qui représentent ensemble la grande majorité des cas d'hépatite virale. Il s'agit d'un virus à ARN enveloppé de la famille des Flaviviridae, qui semble avoir un spectre d'hôte étroit. Les humains et les chimpanzés sont les seules espèces connues sensibles à l'infection, avec les deux espèces qui développent une maladie similaire. Une caractéristique importante de ce virus est la mutabilité relative de son génome, qui à son tour est probablement liée à la forte propension (80%) d'induire une infection chronique. Le HCV est regroupé en plusieurs génotypes distincts qui peuvent être importants dans la détermination de la gravité de la maladie et de la réponse au traitement.

La période d'incubation de l'infection par le HCV, avant l'apparition des symptômes cliniques varie de 15 à 150 jours. Dans les infections aiguës, les symptômes les plus courants sont la fatigue et la jaunisse ; cependant, la

majorité des cas (entre 60 % et 70 %), même ceux qui développent une infection chronique, sont asymptomatiques. Environ 80% des patients nouvellement infectés développent une infection chronique. La cirrhose se développe chez environ 10 % à 20 % des personnes atteintes d'une infection chronique et le cancer du foie se développe dans 1 % à 5 % des personnes atteintes d'une infection chronique sur une période de 20 à 30 ans. La plupart des patients souffrant de cancer du foie sans être atteints de l'infection par le virus de l'hépatite B présentent des preuves de l'infection par le HCV. Les mécanismes par lesquels l'infection à HCV conduit à un cancer du foie sont encore mal connues. L'hépatite C aggrave également la sévérité de la maladie hépatique sous-jacente quand il coexiste avec d'autres conditions hépatiques. En particulier, une maladie du foie progresse plus rapidement chez les personnes atteintes de la maladie alcoolique du foie et infection par le HCV. Le HCV se transmet principalement par contact direct avec du sang humain. La transmission par des transfusions sanguines qui ne sont pas dépistées pour l'infection par le HCV, grâce à la réutilisation d'aiguilles mal stérilisées, de seringues ou d'autre matériel médical, ou par le partage de seringues chez les usagers de drogues, est bien documentée. La transmission sexuelle et périnatale peut également se produire, bien que moins fréquemment. D'autres modes de transmission tels que les pratiques sociales, culturelles et comportementales en utilisant des procédures percutanées (par exemple de l'oreille et piercing, circoncision, tatouage) peuvent se produire si un équipement mal stérilisé est utilisé. Le HCV ne se transmet pas par les éternuements, les accolades, la toux, la nourriture ou l'eau, le partage des ustensiles de cuisine, ou un contact occasionnel.

Dans les pays développés et en voie de développement, les groupes à haut risque comprennent consommateurs de drogues injectables, les receveurs de sang, les hémophiles, les patients dialysés et les personnes à partenaires sexuels multiples qui ont des rapports sexuels non protégés. Dans les pays développés, on estime que 90 % des personnes atteintes d'une infection chronique par le HCV sont les utilisateurs de drogues injectables, anciens et actuels et ceux ayant des antécédents de transfusion de sang non testé ou de produits sanguins. Dans de nombreux pays en développement, où le sang et les produits sanguins sont encore utilisés, les principaux moyens de transmission sont du matériel d'injection non stérile et la transfusion de sang. En outre, les personnes qui pratiquent la scarification et la circoncision traditionnelles sont à risque si elles utilisent ou ré- utilisent des outils non stérilisés.

L'OMS estime que 170 millions de personnes, soit 3 % de la population mondiale, sont infectées par le HCV et risquent de développer une cirrhose et/ou un cancer du foie. La prévalence de l'infection par le HCV dans certains pays d'Afrique, de la Méditerranée orientale, de l'Asie du Sud-est et du Pacifique occidental (lorsque les données de prévalence sont disponibles) est élevée par rapport à certains pays d'Amérique du Nord et en Europe.

Les tests de diagnostic pour le HCV sont utilisés pour prévenir l'infection par le dépistage de sang du donneur

et de plasma, pour établir le diagnostic clinique et de prendre de meilleures décisions concernant la gestion médicale d'un patient. Les tests diagnostiques disponibles dans le commerce aujourd'hui sont basés sur la méthode immuno-enzymatique (EIA) pour la détection d'anticorps spécifiques du HCV. Les EIA peuvent détecter plus de 95 % des patients à infection chronique mais peuvent détecter que 50 % à 70 % des infections aiguës. Un test EIA recombinant (RIBA) qui identifie des anticorps qui réagissent avec les antigènes du HCV est souvent utilisé à titre de test supplémentaire pour la confirmation d'un résultat positif EIA. Le test du HCV circulant par amplification des tests ARN (par exemple polymérase chain reaction ou PCR, ramifié test d'ADN) est également utilisé pour la confirmation des résultats sérologiques ainsi que pour évaluer l'efficacité du traitement antiviral. Un résultat positif indique la présence d'une infection active et un risque de propagation de l'infection et/ou de développement de la maladie chronique du foie.

Les médicaments antiviraux tels que l'interféron seul ou en association avec la ribavirine peuvent être utilisés pour le traitement de personnes souffrant d'hépatite C chronique, mais le coût du traitement est très élevé. Le traitement avec l'interféron seul est efficace chez 10 % à 20 % des patients. L'interféron associé à la ribavirine est efficace chez 30 % à 50 % des patients. La ribavirine ne semble pas être efficace lorsqu'elle est utilisée seule.

Il n'existe aucun vaccin contre le HCV. La recherche est en cours, mais la forte mutabilité du génome du HCV complique le développement de vaccins. Le manque de connaissances de toute réponse immunitaire protectrice après une infection par le HCV constitue également un obstacle à la recherche sur les vaccins. On ne sait pas si le système immunitaire est capable d'éliminer le virus.

Certaines études, cependant, ont montré la présence d'anticorps neutralisants du virus chez les patients infectés par le HCV. En l'absence d'un vaccin, toutes les précautions pour prévenir l'infection doivent être prises, y compris (a) le dépistage et les tests sanguins et d'organes donateurs; (b) l'inactivation des virus de produits dérivés du plasma; (c) la mise en œuvre et la maintenance des pratiques de contrôle des infections dans les établissements de soins de santé, y compris la stérilisation du matériel médical et dentaire; (d) l'incitation au changement de comportement parmi les travailleurs du secteur public et des soins de santé généraux pour réduire la sur-utilisation des injections et à utiliser des pratiques d'injection sécuritaires; et (e) la réduction du risque en apportant conseil aux personnes fortement exposées à la drogue et aux pratiques sexuelles.

Le génome code pour des composants de structure, une protéine de nucléocapside et deux glycoprotéines d'enveloppe, et des composants fonctionnels impliqués dans la réplication du virus et le traitement de la protéine. La région de codage de la nucléocapside semble être le plus conservateur parmi les isolats obtenus partout dans le monde.

C. PRINCIPE DU TEST

Des plaques microtitre sont recouvertes d'antigènes spécifiques du HCV provenant de régions du «noyau» et «ns» codant pour des déterminants antigéniques conservateurs et immunodominants (base peptide recombinant NS3, NS4 et NS5 peptides).

La phase solide est d'abord traitée avec l'échantillon dilué et Ab sont capturés HCV, si présents, par les antigènes. Après élimination par lavage de tous les autres composants de l'échantillon, dans la deuxième incubation les anticorps HCV liés, ainsi que les IgG et IgM, sont détectés par addition d'anticorps Higg & Manti spécifiques polyclonaux, marqués à la peroxydase (HRP).

L'enzyme capturé sur la phase solide, qui agit sur le mélange de substrat TMB, génère un signal optique qui est proportionnel à la quantité d'anticorps anti-HCV présents dans l'échantillon. Une valeur seuil permet d'interpréter les densités optiques résultant d'anticorps HCV négatifs et positifs

D. COMPOSITION

Le kit contient des réactifs pour 96 tests (réf. 071067), 192 tests (réf. 071064), ou 480 tests (réf 071068).

Plaque microtitre	1
Contrôle Négatif	1x4 mL/flacon
Contrôle Positif	1x2 mL/flacon
Calibrateur	2 flacons
Tampon de l concentré 20x	1x50 mL/flacon
Conjugué	1x16 mL/flacon
Diluant pour échantillon	1x50 mL/flacon
Substrat TMB	1x16 mL/flacon
Solution d'Arrêt	1x15 mL/flacon
Diluant de Dosage	1x8 mL/flacon
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des plaques microtitre	2
Nombre de tests	96
Référence	071067

Plaque microtitre	2
Contrôle Négatif	2x4 mL/flacons
Contrôle Positif	1x4 mL/flacon
Calibrateur	3 flacons
Tampon de lavage concentré 20x	2x50 mL/flacons
Conjugué	2x16 mL/flacons
Diluant pour échantillon	2x50 mL/flacons
Substrat TMB	2x16 mL/flacons
Solution d'Arrêt	2x15 mL/flacons
Diluant de Dosage	2x8 mL/flacons
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des plaques microtitre	4
Nombre de tests	192
Référence	071064

Plaque microtitre	5
Contrôle Négatif	1x20 mL/flacon
Contrôle Positif	1x10 mL/flacon
Calibrateur	7 flacons
Solution de Lavage Concentré 20x	5x50 mL/flacons
Conjugué	2x40 mL/flacons
Diluant pour échantillon	5x50 mL/flacons
Substrat TMB	2x40 mL/flacons
Solution d'Arrêt	2x40 mL/flacons
Diluant de Dosage	1x40 mL/flacon
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des plaques microtitre	10
Nombre de tests	480
Référence	071068

1. Plaque microtitre

12 barrettes de 8 puits revêtus de peptide de noyau, peptides NS3 recombinant, NS4 et NS5. Les plaques sont hermétiquement emballées sous sachet en aluminium avec dessicatif.

La plaque microtitre doit être amenée à température ambiante (18...24°C) avant d'ouvrir le sachet. Les barrettes non utilisées doivent être rangées dans le sachet, qui doit être scellé et conservé à 2...8°C, en présence de l'agent dessicatif.

2. Contrôle Négatif

Prêt à l'usage. Il contient 10 mM de tampon Na-citrate pH 6,0 ± 0,1, 2% de caséine en tant que base de protéines et 0,1% de Proclin 150 à titre de conservateur. Le contrôle négatif est de couleur vert olive codé.

3. Contrôle Positif

Prêt l'usage. Il contient des protéines du sérum de chèvre à 1%, des anticorps humains anti- HCV positifs, un tampon 10 mM Na-citrate pH 6,0 ± 0,1, 0,5% de Tween 20, 0,09% Na-azide et 0,1% de Proclin 150 en tant que conservateurs. Le contrôle positif est de couleur vert foncé codé.

Remarque importante : L'absence d'agents pathogènes viables dans le contrôle positif ne peut pas être pleinement assurée, le réactif doit donc être manipulé comme un produit potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

4. Calibrateur

Calibrateur lyophilisé. À dissoudre avec le volume de l'eau de qualité EIA rapporté sur l'étiquette. Il contient des protéines de sérum bovin fœtal, anticorps humains anti-HCV dont le contenu est calibré sur l'a norme de travail NIBSC code 06/188-006, un tampon 10 mM Na-citrate pH du à 6,0 ± 0,1, 0,3 mg/mL de sulfate de gentamicine et 0,1% de Proclin 150 à titre de conservateurs.

Remarque importante : l'absence d'agents pathogènes viables dans le calibrateur ne peut pas être pleinement assurée, le réactif doit donc être manipulé comme un produit potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Remarque : Le volume nécessaire pour dissoudre le contenu de la fiole peut varier d'un lot à l'autre. Veuillez utiliser le volume adéquat indiqué sur l'étiquette.

5. Tampon de Lavage Concentré 20x

Solution concentrée à 20 volumes. Une fois diluée, la solution de lavage (tampon de lavage dilué) contient 10 mM de tampon de phosphate pH 7,0 ± 0,2, 0,05% de Tween 20 et 0,05% de Proclin 150.

Après dilution, la solution de lavage est stable pendant 1 semaine à 2...8°C.

6. Conjugué

Réactif prêt à l'emploi De couleur rouge codée. Il contient des anticorps polyclonaux de chèvre conjugués à de la peroxydase de raifort à IgG et IgM humains, 5% de BSA, 10 mM de tampon de citrate pH 6,4 ± 0,1, 0,1% de Proclin et 0,05% de Tween 20 comme agent de conservation.

7. Substrat TMB

Composant prêt à l'emploi. Il contient 50 mM de tampon citrate-phosphate pH 3.5-3.8, 4% de diméthylsulfoxyde, 0,03% de tétra-méthyl-benzidine ou TMB et 0,02% de peroxyde d'hydrogène ou H₂O₂. Mélanger doucement avant utilisation.

Remarque : À conserver à l'abri de la lumière car sensible à un fort éclairage.

8. Diluant de Dosage

Composant prêt à l'emploi. Il contient du sérum de chèvre, 10 mM de tris solution tamponnée à pH 8,0 ± 0,1 contenant 0,1% de Proclin 150 et 0,09% d'azide de Sodium pour le prétraitement des échantillons et les témoins dans la plaque, le blocage de l'interférence.

9. Solution d'Arrêt

Composant prêt à l'emploi.

Il contient une solution de H₂SO₄ 0,3 M. Mélanger doucement avant utilisation.

10. Diluant pour échantillon

Composant prêt à l'emploi et de couleur vert foncé codée. Il contient 1% de caséine, 10 mM de tampon Na-citrate pH 6,0 ± 0,1 et 0,1% de Proclin 150 en tant que conservateur.

À utiliser pour diluer l'échantillon.

Remarque: Le diluant passe du vert olive au vert bleuâtre foncé en présence de l'échantillon.

E. MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

1. Micropipettes calibrées (200 µL et 10 µL) et embouts jetables en plastique.
2. Eau de qualité EIA (bidistillée ou déminéralisée, traitée au charbon actif pour éliminer les produits chimiques oxydants utilisés en tant que désinfectants).
3. Minuterie réglable jusqu'à 60 minutes au moins.
4. Papier absorbant.
5. Incubateur thermostatique calibré pour plaque microtitre ELISA (sec ou humide) réglé sur +37°C.
6. Lecteur de plaques microtitre ELISA avec filtre à 450 nm (lecture) et, si possible, avec filtre à 620-630 nm (soustraction des blancs).
7. Station de lavage calibrée pour plaques microtitre ELISA.
8. Vortex ou instrument de mélange similaire.

F. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Le kit doit être utilisé uniquement par un personnel technique qualifié et correctement formé, sous la supervision d'un médecin responsable du laboratoire.
Cette notice doit être lue attentivement avant l'utilisation du produit.
2. La Fiche de données de sécurité doit être lue attentivement avant l'utilisation du produit.
3. Lorsque le kit est utilisé pour le dépistage d'unités de sang et de composants sanguins, il doit être utilisé dans un laboratoire certifié et qualifié par l'autorité nationale compétente (Ministère de la Santé ou entité similaire) pour mener à bien ce type d'analyse.
4. Tout le personnel participant à la réalisation du test doit porter des vêtements de protection, des gants de laboratoire sans talc et des lunettes. L'utilisation de dispositifs pointus (aiguilles) ou coupants (lames) doit être évitée. Tout le personnel impliqué doit être formé sur les procédures de biosécurité, comme recommandé par le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis et signalé à l'Institut national de la publication de Santé : « prévention des risques biotechnologiques en laboratoires microbiologiques et biomédicaux » éd. 1984.
5. Tout le personnel impliqué dans la manipulation des échantillons doit être vacciné contre le VHB et le VHA, pour lesquels des vaccins sûrs et efficaces sont disponibles.
6. L'environnement de laboratoire doit être contrôlé afin d'éviter les contaminants tels que la poussière ou des agents microbiens air, lors de l'ouverture des flacons du kit et des plaques microtitre et lors du test. Protéger le substrat (TMB) de la lumière forte et éviter les vibrations de la surface de la table sur laquelle le test est effectué.
7. Dès réception, conserver le kit à 2...8°C dans un réfrigérateur à température contrôlée ou une chambre froide.
8. Ne pas échanger les composants entre différents lots de kits. Il est recommandé de ne pas échanger les composants de deux kits d'un même lot.
9. Vérifier que les réactifs sont clairs et ne contiennent pas de particules ou grumeaux lourds visibles. Le cas échéant, aviser le responsable du laboratoire en vue des procédures nécessaires pour le remplacement du kit.
10. Éviter la contamination croisée entre les échantillons de sérum/plasma en utilisant des embouts jetables et en les changeant après chaque échantillon.
11. Éviter la contamination croisée entre les réactifs en utilisant des embouts jetables et en les changeant après utilisation.
12. Ne pas utiliser le kit après la date de péremption indiquée sur l'emballage externe et les étiquettes intérieures (flacons).
13. Traiter tous les échantillons comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Tous les échantillons de sérum humain doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2, comme recommandé par le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis, conformément aux indications des Instituts de la publication de Santé : « prévention des risques biotechnologiques en laboratoires microbiologiques et biomédicaux », éd. 1984.

14. L'utilisation de matière plastique-céramique jetable est recommandée dans la préparation des composants liquides ou lors du transfert des composants à des postes de travail informatisés, afin d'éviter toute contamination croisée.
15. Les déchets produits lors de l'utilisation du kit doivent être éliminés conformément aux directives et lois nationales en matière de déchets de laboratoire et substances chimiques et biologiques. En particulier, les déchets liquides générés par le procédé de lavage, de résidus de contrôles et des échantillons doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux et inactivés avant élimination. Les procédures d'inactivation suggérées sont le traitement avec une concentration finale de 10% d'eau de javel pendant 16-18 heures ou l'inactivation thermique par autoclave à 121°C pendant 20 min.
16. Les fuites accidentelles provenant d'échantillons et les opérations doivent être adsorbées avec du papier absorbant imbibé d'eau de Javel, puis avec de l'eau. Les papiers doivent ensuite être jetés dans des conteneurs appropriés pour déchets de laboratoire/d'hôpital.
17. La Solution d'Arrêt contient 0,3M d'acide sulfurique. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.
18. Se débarrasser des solutions de réactifs contenant de l'azoture de sodium comme agent de conservation selon les réglementations locales, provinciales et nationales. Pour éliminer les réactifs contenant de l'azoture, rincer à l'aide de grandes quantités d'eau. Éliminer avec prudence car l'azoture de sodium peut former des composés explosifs au contact prolongé avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre.
19. Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
20. D'autres déchets générés par l'utilisation du kit (ex. embouts pour échantillons et contrôles, plaques microtitre usagées) doivent être traités comme étant potentiellement infectieux et éliminés conformément aux directives et lois nationales en matière de déchets de laboratoires.
21. Ne pas prélever en aspirant avec la bouche.

G. ÉCHANTILLONS : PRÉPARATION ET MISES EN GARDE

1. Le sang est prélevé de manière aseptique par ponction veineuse et le plasma ou le sérum est préparé en utilisant des techniques standard de préparation des échantillons pour analyse en laboratoire clinique. Aucune influence n'a été observée dans la préparation de l'échantillon avec le citrate, l'EDTA et l'héparine.
2. Éviter tout ajout de conservateurs aux échantillons ; en particulier de l'azide de sodium car ce produit chimique affecterait l'activité enzymatique du conjugué, générant des résultats faussement négatifs.
3. Les échantillons doivent être clairement identifiés par des codes ou des noms afin d'éviter une mauvaise interprétation des résultats. Lorsque le kit est utilisé

pour le dépistage d'unités de sang, l'étiquetage de code à barres et la lecture électronique sont fortement recommandés.

4. Hémolysé (rouge) et visiblement hyperlipémique (« laiteux ») les échantillons doivent être jetés car ils pourraient générer des résultats erronés. Les échantillons contenant des résidus de fibrine ou particules lourdes ou de filaments microbiens et les organismes doivent être jetés car ils pourraient donner lieu à de faux résultats.
5. Les sérums et le plasma peuvent être conservés à +2...8°C jusqu'à cinq jours après la collecte. Pour les périodes de stockage plus longues, les échantillons peuvent être conservés congelés à -20°C pendant plusieurs mois. Les échantillons congelés ne doivent pas être congelés/décongelés plus d'une fois car cela peut générer des particules qui pourraient affecter le résultat du test.
6. Si des particules sont présentes, centrifuger à 2 000 tours par minute pendant 20 min ou filtrer à l'aide de filtres de 0,2-0.8µ pour nettoyer l'échantillon à tester.

H. PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET MISES EN GARDE

Une étude menée sur un kit ouvert n'a pas signalé de perte d'activité correspondante, jusqu'à 1 réutilisation de l'appareil et jusqu'à 6 mois.

1. Plaque microtitre:

Laisser la microplaque atteindre la température ambiante (environ 1 heure) avant d'ouvrir le sachet. Vérifier que le dessicatif n'a pas tourné au vert foncé, indiquant un défaut de fabrication. Le cas échéant appeler le Service Clientèle d'Adaltis.

Les barrettes non utilisées doivent être placées à l'intérieur du sachet en aluminium, avec le dessicatif fourni, bien fermé et stocké à +2...8°C. Après la première ouverture, bandes restantes sont stables jusqu'à l'indicateur d'humidité à l'intérieur du sachet dessicatif passe du jaune au vert.

2. Contrôle négatif :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

3. Contrôle Positif:

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation. Manipuler ce composant comme potentiellement infectieux.

4. Calibrateur:

Dissoudre soigneusement le contenu du flacon lyophilisé avec le volume d'eau de qualité EIA signalé sur l'étiquette. Mélangez bien le vortex avant utilisation. Manipuler ce composant comme potentiellement infectieux.

Remarque : Lorsque dissous le calibrateur n'est pas stable. Magasin à -20°C.

5. Solution de Lavage Concentré 20x (flacon de 50 mL):

La totalité du contenu de la solution concentrée 20x doit être diluée avec de l'eau de qualité EIE jusqu'à 1000 mL (le volume est indiqué sur l'étiquette) et mélangée délicatement avant l'utilisation. Comme certains cristaux de sel peuvent être présents dans le flacon, prendre soin

de dissoudre tout le contenu lors de la préparation de la solution. Lors de la préparation, éviter la formation de mousse car la présence de bulles pourrait influencer l'efficacité des cycles de lavage.

Remarque : Une fois diluée, la solution de lavage est stable pendant 1 semaine à +2...8°C.

6. Conjugué :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

Veiller à ne pas contaminer le liquide avec des produits chimiques oxydants, de la poussière entraînée par l'air ou des microbes. Si ce composant doit être transféré, n'utiliser que des récipients jetables en plastique, si possible stériles.

7. Substrat TMB :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

Éviter la contamination du liquide avec des produits chimiques oxydants, de la poussière entraînée par l'air ou des microbes. Ne pas exposer à un fort éclairage à des agents oxydants et à des surfaces métalliques. Si ce composant doit être transféré, n'utiliser que des récipients jetables en plastique, si possible stériles.

8. Diluant de Dosage :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

9. Solution d'Arrêt:

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

10. Diluant pour échantillon :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

I. INSTRUMENTS ET ACCESSOIRES UTILISÉS AVEC LA TROUSSE

1. Les micropipettes doivent être calibrées pour délivrer le volume correct nécessaire pour le test et doivent être soumises à une décontamination régulière (alcool ménager, solution à 10% d'eau de javel, désinfectants de qualité hospitalière) de ces pièces qui pourraient accidentellement entrer en contact avec l'échantillon ou les composants du kit. Elles doivent également être régulièrement entretenues afin de fournir une précision de 1% et une exactitude de $\pm 2\%$. La décontamination des fuites ou des résidus de composants du kit devrait également être effectuée régulièrement.
2. L'incubateur ELISA doit être réglé à +37°C (tolérance de $\pm 0,5^\circ\text{C}$) et vérifié régulièrement pour assurer le maintien d'une bonne température. Les deux incubateurs à sec et des bains d'eau sont appropriés pour les incubations, à condition que l'instrument soit homologué pour l'incubation des tests ELISA.
3. Le laveur ELISA est extrêmement important pour les performances globales du test. Le laveur doit être soigneusement homologué et correctement optimisé. Habituellement 4-5 cycles de lavage (+ dispense d'aspiration de la solution de lavage 350 µL/puits = 1 cycle) sont suffisants pour faire en sorte que l'essai fonctionne comme prévu. Un temps de trempage de 20-30 secondes entre les cycles est proposé. Afin de régler correctement leur nombre, il est recommandé d'exécuter un test avec les contrôles du kit/calibrateur et des échantillons de référence négatifs

et positifs bien caractérisés, et de vérifier qu'ils correspondent aux valeurs indiquées ci-dessous dans les sections O "Contrôle de Qualité Interne". L'étalonnage régulier des volumes délivrés et entretien (décontamination et nettoyage des aiguilles) du laveur doit être effectué selon les instructions du fabricant.

4. Les temps d'incubation ont une tolérance de $\pm 5\%$.
 - ✓ Méthode à courte incubation (pour la 1^{ère} / 2^{ème} incubation, tolérance entre 43 min à 47 min ; pour la 3^{ème} incubation, tolérance entre 14 et 16 min).
 - ✓ Méthode incubation standard (pour la 1^{ère} incubation tolérance entre 57 et 63 minutes, pour la 2^{ème} et la 3^{ème} incubation, tolérance entre 29 et 31 minutes).
5. Le lecteur de plaques microtitre ELISA doit être équipé d'un filtre de lecture de 450 nm et de préférence d'un second filtre (620-630nm) à des fins d'interception. Ses performances standard doivent être (a) bande passante ≤ 10 nm; (b) gamme d'absorbance de 0 à $\geq 2,0$; (c) linéarité $\geq 2,0$; répétabilité $\geq 1\%$. L'interception est effectuée sur le bien identifié dans la section « Procédure de test ». Le système optique du lecteur doit être étalonné périodiquement pour garantir que la densité optique correcte est mesurée. Il doit être entretenu régulièrement conformément aux instructions du fabricant.
6. Lors de l'utilisation d'une station de travail ELISA automatisée, toutes les étapes critiques (dispense, incubation, lavage, lecture, agitation, traitement des données) doivent être soigneusement réglées, calibrées, contrôlées et entretenues régulièrement afin de correspondre aux valeurs indiquées dans les sections O "Contrôle de Qualité Interne". Le protocole de dosage doit être installé dans le système d'exploitation de l'unité et validé pour le laveur et le lecteur. En outre, la partie de traitement des liquides de la station (dispensation et lavage) doit être validée et correctement configurée. Une attention particulière doit être accordée afin d'éviter de conserver les aiguilles usagées pour la dispense et le lavage. Cela doit être étudié et contrôlé pour minimiser la possibilité de contamination des puits adjacents en raison des échantillons fortement réactifs, conduisant à des résultats faussement positifs. L'utilisation de postes de travail automatisés ELISA est recommandée pour le dépistage du sang et lorsque le nombre d'échantillons à tester dépasse 20-30 unités par opération.

L. CONTRÔLES ET PROCÉDURES PRÉALABLES AU TEST

1. Vérifier la date de péremption du kit imprimée sur l'étiquette extérieure de l'emballage. Ne pas utiliser si la date est dépassée.
2. Vérifier que les composants liquides ne sont pas contaminés par des particules ou agglomérats visibles à l'œil nu. Vérifier que le substrat TMB est incolore ou bleu pâle en aspirant une petite quantité avec une pipette en plastique transparente stérile. S'assurer qu'aucun bris ne s'est produit au cours du transport et qu'aucun débordement de liquide ne se trouve à l'intérieur de la boîte. Vérifier que le sachet

en aluminium, contenant la plaque microtitre, n'est pas percé ou endommagé.

3. Diluer tout le contenu du tampon de lavage concentré 20x comme décrit ci-dessus.
4. Dissoudre le calibre de la façon décrite ci-dessus.
5. Laisser tous les autres composants atteindre la température ambiante (environ 1 heure), puis mélanger comme décrit.
6. Régler l'incubateur ELISA à $+37^{\circ}\text{C}$ et préparer le laveur ELISA en l'amorçant avec la solution de lavage diluée, d'après les instructions du fabricant. Définir le bon nombre de cycles de lavage indiqué en section I.3
7. Vérifier que le lecteur ELISA a été réglé au moins à 20 minutes avant de lire.
8. En cas d'utilisation d'un poste de travail automatisé, l'allumer, vérifier les paramètres et s'assurer d'utiliser le protocole de dosage exact.
9. Vérifier que les micropipettes sont réglées au volume requis.
10. Vérifier que tous les autres équipements sont disponibles et prêts à utiliser.
11. En cas de problèmes, ne pas poursuivre le test et informer le superviseur.

M. PROCÉDURE DE TEST

Le test doit être effectué conformément aux indications ci-dessous, en prenant soin de conserver le même temps d'incubation pour tous les échantillons testés.

La procédure d'analyse peut être effectuée en exécutant deux fois les procédures d'incubation. Sélectionner la méthode correspondant au règlement local :

1. Incubation Standard (1^{ère} incubation 60 minutes, 2^{ème} et 3^{ème} incubation 30 minutes)
2. Incubation Courte (1^{ère} et 2^{ème} incubation 45 minutes, 3^{ème} incubation 15 minutes)

1. Incubation Standard - Dosage manuel :

1. Placer le nombre requis de micro-puits dans le support. Laissez le 1^{er} puits vide pour l'opération de suppression.
2. Distribuer 200 μL de Contrôle Négatif, en trois exemplaires, 200 μL Calibrateur en double et 200 μL Contrôle Positif en unique dans les puits appropriés. Ne pas diluer les contrôles et l'étalon car ils sont pré-dilués, prêt à l'emploi !
3. Ajouter 200 μL de Diluant pour Échantillon dans tous les puits, puis distribuer 10 μL d'échantillon dans chacun correctement identifié. Mélanger doucement la plaque, en évitant le débordement et la contamination des puits adjacents, afin de disperser complètement l'échantillon dans son diluant.

Remarque importante: Contrôler que la couleur du diluant de l'échantillon, lors de l'ajout de l'échantillon, passe du vert clair au vert bleuâtre foncé, en contrôlant que l'échantillon a bien été ajouté.

4. Distribuer 50 μL de Diluant de Dosage dans tous les contrôles/étalon et puits d'échantillon. Vérifier que la couleur des échantillons a tourné au bleu foncé.
5. Incuber la plaque microtitre pendant **60 min à 37°C** .
Note importante : Les bandes doivent être scellées avec la feuille d'étanchéité adhésive fournie, que lorsque le test est effectué manuellement. Ne couvrez

pas les bandes lors de l'utilisation des instruments automatiques ELISA.

6. Laver la plaque microtitre avec un laveur automatique en distribuant et aspirant 350 µL/puits de solution de lavage diluée comme décrit précédemment (section I.3).
7. Pipeter 100 µL de conjugué enzymatique dans chaque puits, sauf les premier et second puits réservés à la soustraction des blancs et couvrir avec la feuille adhésive. S'assurer que ce réactif de couleur rouge a été distribué dans tous les puits, sauf A1.

Remarque importante: Veiller à ne pas toucher la surface intérieure du plastique du puits avec le conjugué enzymatique. Une contamination pourrait se produire.

8. Incuber la plaque microtitre pendant **30 min à 37°C**.
9. Laver les puits comme indiqué en section I.3.
10. Introduire à la pipette 100 µL mélange de Substrat TMB dans chaque puits, puits vide inclus. Puis incuber la plaque microtitre à température ambiante (18-24°C) pendant **30 minutes**.

Remarque importante: Ne pas exposer à un fort éclairage direct. Un fort fond pourrait être généré.

11. Pipeter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 10 pour arrêter la réaction enzymatique. L'addition d'une solution d'arrêt fera passer le contrôle positif et les échantillons positifs du bleu au jaune.
12. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit en section I.5, au filtre de 450nm (lecture) et si possible à 620-630nm (soustraction de fond), en obturant l'instrument sur A1.

Remarques importantes:

1. Si le deuxième filtre n'est pas disponible, s'assurer qu'aucune empreinte digitale n'est présente sur le fond du puits avant lecture à 450 nm. Les empreintes digitales pourraient générer des résultats faussement positifs sur la lecture.
2. La lecture devrait idéalement être effectuée immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt, mais jamais plus de 20 minutes après. Une auto-oxydation du substrat peut se produire conduisant à un fond supérieur.
3. Il a été démontré qu'une agitation à 350 ± 150 tours par minute pendant l'incubation augmentait la sensibilité de l'essai d'environ 20%.

2. Incubation Courte- Dosage manuel:

1. Placer le nombre requis de micro-puits dans le support. Laisser le 1^{er} puits vide pour l'opération d'obturation.
2. Distribuer 200 µL de Contrôle Négatif, en trois exemplaires, 200 µL Calibrateur en double et 200 µL de Contrôle Positif en simple dans les puits appropriés. Ne pas diluer les contrôles et l'étalon car ils sont pré-dilués, prêt à l'emploi !
3. Ajouter 200 µL de Diluant pour Échantillon dans tous les puits d'échantillon; puis distribuer 10 µL d'échantillon dans chaque puits correctement

identifié. Mélanger doucement la plaque, en évitant le débordement et la contamination des puits adjacents, afin de disperser complètement l'échantillon dans son diluant.

Remarque importante: Contrôler que la couleur du diluant de l'échantillon, lors de l'addition de l'échantillon, passe du vert clair au vert bleuâtre foncé, en vérifiant que l'échantillon a bien été ajouté.

4. Distribuer 50 µL Diluant de Dosage dans tous les puits de contrôles/étalons et d'échantillon. Vérifier que la couleur des échantillons a tourné au bleu foncé.
5. Incuber la plaque microtitre pendant **45 min à 37°C**. Remarque importante : Les bandes doivent être scellées avec la feuille d'étanchéité adhésive fournie uniquement lorsque le test est effectué manuellement. Ne pas couvrir les bandes lors de l'utilisation des instruments automatiques ELISA.
6. Laver la microplaque avec un laveur automatique en fournissant et en aspirant 350 µL/puits de solution de lavage diluée comme indiqué à la section I.3.
7. Introduire à la pipette 100 µL de Conjugué Enzymatique dans chaque puits, sauf le 1^{er} puits d'obturation, et couvrir avec le scellant. Vérifiez que ce composant de couleur rouge a été distribué dans tous les puits, sauf A1.

Remarque importante: Veiller à ne pas toucher la surface intérieure en plastique du puits avec l'embout rempli de conjugué enzymatique. Une contamination pourrait se produire.

8. Incuber la plaque microtitre pendant **45 min à +37°C**.
9. Laver les micro-puits comme indiqué en section I.3.
10. Pipeter 100 µL de mélange de Substrat TMB dans chaque puits, puits blanc inclus. Puis incuber la plaque microtitre à température ambiante (18-24°C) pendant **15 minutes**.

Remarque importante: Ne pas exposer à un fort éclairage direct. Un fond élevé pourrait être généré.

11. Pipeter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme au point 10 pour arrêter la réaction enzymatique. L'addition d'une solution d'arrêt fera passer le contrôle positif et les échantillons positifs du bleu au jaune.
12. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit en section I.5, au filtre de 450nm (lecture) et si possible à 620-630nm (soustraction de fond), en obturant l'instrument sur A1.

Remarques importantes :

1. Si le deuxième filtre n'est pas disponible, s'assurer qu'aucune empreinte digitale n'est présente sur le fond du puits avant lecture à 450 nm. Les empreintes digitales pourraient générer des résultats faussement positifs sur la lecture.
2. La lecture devrait idéalement être effectuée immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt, et jamais plus de 20 minutes après. Une auto-

oxydation du substrat peut se produire conduisant à un fond supérieur.

3. Il a été démontré qu'une agitation à 350 ± 150 tours par minute pendant l'incubation augmentait la sensibilité de l'essai d'environ 20%.

N. SCHÉMA DU TEST

Méthode	Opérations (Incubation Standard)	Opérations (Incubation Courte)
Etalons et Calibrateur	200 µL	200 µL
Diluant de l'Échantillon et Échantillon	200 µL diluant + 10 µL échantillon	200 µL diluant + 10 µL échantillon
Diluant de Dosage	50 µL	50 µL
1^{ère} incubation	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Température	+37°C	+37°C
Étape de lavage	4-5 cycles	4-5 cycles
Conjugué Enzymatique	100 µL	100 µL
2^{ème} incubation	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Température	+37°C	+37°C
Étape de lavage	4-5 cycles	4-5 cycles
Substrat TMB	100 µL	100 µL
3^{ème} incubation	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Température	Température ambiante (18...24°C)	Température ambiante (18...24°C)
Solution d'Arrêt	100 µL	100 µL
Lecture DO	450/620nm	450/620nm

Un exemple de système de dispense est indiqué ci-dessous (valable pour les deux procédures de temps d'incubation) :

Plaque microtitre

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Légende : BLK = Blanc NC = Contrôle Négatif
CAL = Calibrateur PC = Contrôle Positif S = Échantillon

O. CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Un contrôle est effectué sur les contrôles et le calibrateur une fois que le kit est utilisé afin de vérifier si leurs valeurs sont OD450/620nm comme prévu et reportés dans le tableau ci-dessous.

Vérifier	Condition exigée
Puits blanc	Valeur de la DO à 450 nm/620 nm < 0,100
Contrôle Négatif (NC)	<0,050 signifie OD450/620nm après suppression
Calibrateur	S/Co >1.1
Contrôle Positif	Valeur de la DO à 450 nm/620 nm >1.000

Si les résultats de l'essai correspondent aux exigences énoncées ci-dessus, passer à la section suivante.
Sinon, ne pas aller plus loin et effectuer les contrôles suivants :

Problème	Vérifier
Puits blanc DO à 450 nm > 0,100	1. que la solution de substrat n'a pas été contaminée au cours de l'essai
Contrôle Négatif (NC) DO à 450 nm après suppression > 0.050	1. Que la procédure de lavage et les paramètres de lavage sont validés comme dans l'étude de pré-qualification ; 2. Que la solution de lavage appropriée a été utilisée et le laveur a été amorcé avec celle-ci avant l'utilisation ; 3. Qu'aucune erreur n'a été commise dans la procédure de test (dispense de contrôle positif au lieu du négatif) ; 4. Qu'aucune contamination du contrôle négatif ou des puits où le contrôle a été dispensé ne s'est produite en raison de déversements d'échantillons positifs ou du conjugué enzymatique ; 5. Les micropipettes n'ont pas été contaminées avec des échantillons positifs ou avec le conjugué enzymatique 6. que les aiguilles du laveur sont pas bloquées ou partiellement obstruées.
Calibrateur S/Co<1.1	1. Que la procédure a été effectuée correctement ; 2. Qu'aucune erreur s'est produite lors de la distribution (ex. : dispense de contrôle négatif à la place de l'étalon) 3. Que la procédure de lavage et les paramètres de lave sont validés comme dans l'étude de pré-qualification ; 4. qu'aucune contamination externe du calibre ne s'est produite.
Contrôle Positif DO à 450 nm <1.000	1. Que la procédure a été effectuée correctement ; 2. Qu'aucune erreur ne s'est produite lors de la distribution de la commande (dispense de contrôle négatif à la place du contrôle positif. Dans ce cas, le contrôle négatif aura une valeur d'OD450nm> 0,150, aussi. 3. Que la procédure de lavage et les paramètres de lavage sont validés comme dans l'étude de pré-qualification ; 4. qu'aucune contamination externe du contrôle positif n'a eu lieu.

Si l'un des problèmes ci-dessus a eu lieu, signaler le problème au superviseur pour les actions à mener.

P. RÉSULTATS

Les résultats des tests sont calculés au moyen d'une valeur seuil déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC soit} + 0.350$$

La valeur trouvée pour le test est utilisée pour l'interprétation des résultats de la manière décrite au paragraphe suivant.

Q. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests sont interprétés en tant que rapport de l'échantillon OD450nm et de la valeur Cut-Off (ou S/Co) selon le tableau suivant :

S/Co	Interpretation
< 0.9	Négatif
0.9 - 1.1	Équivoque
> 1.1	Positif

Un résultat négatif indique que le patient n'a pas été contaminé par le HCV ou que l'unité de sang peut être transfusée. Tout patient présentant un résultat équivoque devrait être dépisté à nouveau sur un deuxième échantillon prélevé 1-2 semaines plus tard et examiné. L'unité de sang ne doit pas être transfusée.

Un résultat positif indique une infection par le HCV ; le patient doit donc être traité en conséquence ou l'unité de sang doit être jetée.

Remarques importantes:

1. L'interprétation des résultats doit se faire sous la supervision du responsable du laboratoire pour réduire le risque d'erreurs de jugement et de mauvaises interprétations.
2. Tout résultat positif doit être confirmé par une méthode alternative capable de détecter les anticorps IgG et IgM (test de confirmation) avant que le diagnostic de l'hépatite virale soit formulé.
3. Comme l'a montré l'évaluation de la performance du produit, le dosage est capable de détecter la séroconversion anticorps anti-HCV de base **plus tôt** que d'autres kits commerciaux. Par conséquent, un résultat positif, non confirmé avec ces kits commerciaux, ne doit pas être écarté à titre de faux résultat positif ! L'échantillon doit être de toute façon soumis à un test de confirmation.
4. Tant que le test est capable de détecter aussi des anticorps IgM, des résultats discordants avec les autres produits du commerce pour la détection des anticorps anti-HCV - à défaut d'anti-hIgM conjugué dans la formulation du traceur enzymatique et donc dépourvus de réactivité IgM - peuvent être présents. La vraie positivité de l'échantillon pour les anticorps anti-HCV doit être ensuite confirmée par l'examen aussi de la réactivité IgM, important pour le diagnostic de l'infection par le HCV.
5. Lorsque les résultats des tests sont transmis par le laboratoire à un centre informatique, il faut veiller à éviter le transfert de données erronées.
6. Le diagnostic de l'infection virale de l'hépatite doit être fait et remis au patient exclusivement par un médecin qualifié.

Un exemple de calcul est rapporté ci-dessous :

Les données suivantes ne doivent pas être utilisées à la place des chiffres réels obtenus par l'utilisateur.
Contrôle Négatif : 0.019 - 0,020 à 0,021 OD450nm

Valeur Moyenne : 0,020 à 0,050 OD450nm Basse - Accepté
Contrôle positif : 2.189 OD450nm
Supérieur à 1.000 - Accepté

Cut-Off = 0,020 0,350 = 0,370

Calibrateur : 0,550 à 0,530 OD450nm

Valeur Moyenne : 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S / Co supérieures à 1,1 - Accepté

Échantillon 1 : 0,070 OD450nm

Échantillon 2 : 1.690 OD450nm

Échantillon 1 S / Co < 0,9 = négatif

Échantillon 2 S / Co > 1.1 = positif

R. PERFORMANCES

L'évaluation de la performance a été réalisée conformément aux spécifications techniques communes ou CTS (art. 5, chapitre 3 de la directive IVD 98/79/CE) et aux deux procédures d'incubation (standard et courts).

1. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection du test a été calculée en utilisant le test d'incubation court selon la norme de travail britannique anti-HCV, NIBSC code 06/188-006. Le tableau ci-dessous indique les valeurs moyennes OD450nm de cette norme lorsque dilué dans le plasma négatif, puis examiné.

Dilution	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Facteur	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Plasma Négative	0,25	0,20	0,20

En outre, l'échantillon codé Accurun 1 - série 3000 - fourni par Boston Biomedica Inc., Etats-Unis, a été évaluée "en totalité, donnant les résultats ci-dessous:

Accurun 1 série	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Facteur	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUE

L'évaluation de la performance de l'appareil a été réalisée dans un essai mené sur plus de 5000 échantillons au total.

2.1 Spécificité Diagnostique

Elle est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Un total de plus de 5000 donateurs non sélectionnés, y compris les primo-donneurs, ont été examinés. La spécificité diagnostique a été évaluée contre un kit US approuvé par la FDA.

5043 donneurs de sang ont été testés en fournissant une spécificité de 99,5%. 210 patients hospitalisés ont été dépistés pour le HCV Ab; une spécificité diagnostique de 99,5% a été constatée. En outre, la spécificité du diagnostic a été évaluée en testant 162 échantillons potentiellement interférents (autres maladies infectieuses, anticorps E. coli positif, patients atteints de maladies non virales hépatiques, patients dialysés, femmes enceintes, hémolysés, lipémiques, etc.) Une valeur de spécificité de 100% a été évaluée.

Aucune fausse réactivité due à la méthode de préparation des échantillons n'a été observée. Le plasma, dérivé avec des techniques de préparation (citrate, EDTA et héparine), et les sérums standards différents ont été utilisés pour déterminer la valeur de la spécificité. Les échantillons congelés ont été testés, ainsi, de vérifier les interférences dues à la collecte et au stockage. Aucune interférence n'a été observée.

2.2 Sensibilité Diagnostique

Elle est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. La sensibilité diagnostique a été évaluée à l'extérieur sur un nombre total de 348 échantillons; une sensibilité diagnostique de 100% a été constatée. En interne, plus de 50 autres échantillons positifs ont été testés, en fournissant une valeur de sensibilité diagnostique d'encre 100 %. Les échantillons positifs des infections réalisés selon différents génotypes du HCV ont été Également testés.

De plus, la plupart des panels de séroconversion venant de chez Boston Biomedica Inc., Etats-Unis, (PHV) et Zeptometrix, Etats-Unis, (HCV) ont été étudiés.

Les résultats sont rapportés ci-dessous pour quelques-uns d'entre eux.

Panneau	N° Échantillon	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Remarque:

1. Échantillons positifs détectés

2. HCV v.3.0

Enfin, le produit a été testé sur le panneau EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, fourni par l'Etablissement Français du Sang (EFS), la France, avec les résultats suivants:

EFS Panel Ac HCV

Échantillon	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Valeur Moyenne
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Négative
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positive
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positive
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positive
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positive
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positive

3. PRECISION

Elle a été calculée sur cinq échantillons, un négatif et quatre positifs examinés dans 4 répliques dans chacune des six séries distinctes. La précision obtenue pour les deux protocoles, est équivalente.

Les résultats sont indiqués ci-après :

Résultats intra-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit – 1^{er} Lot (test d'incubation court)

Échantillon	S/Co Moyenne	Précision - %CV		
		Intra Essai	Inter Essai	Total
Négatif	0.03	6.66	10.56	12.48
Positifs	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Résultats intra-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1^{er} lot (test d'incubation longue)

Échantillon	S/Co Moyenne	Precision - %CV		
		Intra Essai	Inter Essai	Total
Négatif	0.04	4.67	12.34	13.19
Positifs	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Résultats inter-lot : EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} Lot (test d'incubation courte)

Échantillon	Precision - %CV		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Négatif	8,65	8,29	6,13
Calibrateur	4,98	4,44	5,38
Positif	4,11	3,11	1,37

La variabilité indiquée dans les tableaux ci-dessus n'a pas abouti à une classification erronée de l'échantillon.

S. SUGGESTIONS DE SOLUTION

Le respect de la procédure de test et les spécifications, ainsi que d'une bonne utilisation de réactifs et de pipetage correct, peut aider à éviter les types d'erreurs suivantes :

ERREUR	CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
OD très différent ($\pm 50\%$) de la DO rapportée sur QC	- Volume incorrect de distribution de réactifs (suggestion : vérifier la correspondance entre le volume distribué par la pipette et celui requis par l'essai ; calibrer à nouveau les pipettes) - Température incorrecte ou mauvais temps d'incubation (suggestion : plus de soin dans le maintien de l'incubateur ; noter le début de l'incubation) - Erreur dans le lavage ou la lecture du photomètre (suggestion : vérifier le fonctionnement ou les paramètres des instruments respectifs) - Contamination de substrat ou conjugué (suggestion :: utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres)
Faibles résultats reproductibles	- Pas de volume constant de distribution d'échantillons ou de réactifs (suggestion : vérifier la précision des pipettes et la correspondance entre le volume distribué par la pipette et celui requis par l'essai ; calibrer à nouveau les pipettes) - Erreur dans le lavage ou en lecture (suggestion : vérifier le fonctionnement ou les paramètres des instruments respectifs) - Contamination de substrat (suggestion : utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres) - La pollution ou la dégradation des réactifs (suggestion : utiliser des conseils appropriés, jetables et des contenants de plastique propres pour réactifs et de haute qualité l'eau distillée ou équivalent)
Aucune réaction colorimétrique Après addition du substrat	- Réactif non pipeté - Forte contamination du conjugué et du substrat - Erreurs dans l'exécution de la procédure d'essai (par exemple de pipetage accidentelle de réactifs dans une mauvaise séquence ou d'un mauvais flacon, etc.)
trop faible réaction (trop faible DO)	- Temps d'incubation trop court, température d'incubation trop faible - Incorrecte dilution du conjugué
Trop grande réaction (DO trop élevé) – incorrecte dilution du conjugué	- Temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée - Qualité de l'eau pour le tampon de lavage insuffisante (bas degré de désionisation) - Lavage insuffisant (conjugué non correctement supprimé)
observations aberrantes	- Contamination des pipettes, des embouts ou des conteneurs - Lavage inconstant et insuffisant (conjugué non correctement éliminé)

ERREUR	CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
CV% intra-série trop élevé	- Réactifs et/ou bandes non préchauffé(e)s à la température ambiante avant de les utiliser - Le plateau du laveur ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)
CV% trop élevé entre les séries	- Conditions d'incubation non constantes (temps, température) - Contrôles et échantillons non distribués en même temps (aux mêmes intervalles) (vérifier ordre de pipetage) - Variation liées à la personne

T. AUTOMATISATION

Les procédures définies dans ces instructions d'utilisation s'appliquent aux tests manuels seulement. Lors de l'utilisation d'instruments automatisés, suivre les procédures qui figurent dans le manuel de l'opérateur fourni par le fabricant de l'appareil. Les laboratoires doivent suivre leurs procédures de validation approuvées pour démontrer la compatibilité de ce produit sur des systèmes automatisés.

U. LIMITATIONS

Des résultats faux positifs répétables, non confirmés par RIBA ou des techniques de confirmation similaires, ont été évalués comme inférieurs à 0,1% de la population normale.

Il a été observé que des échantillons congelés contenant des particules ou agrégats de fibrine après décongélation généraient des résultats erronés.

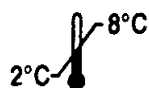
REFERENCES

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998 ;44 :98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993 ;167 :66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993 ;269 :392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994 ;169 :90-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995 ;171 :768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993 ;153 :1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.

ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF	071067	 96
REF	071064	 192
REF	071068	 480



Ezt a használati utasítást figyelmesen el kell olvasni a termék használatát megelőzően.
A tesztek megbízhatósága nem garantált, ha ezen használati utasításokban foglaltaktól bármiben eltérnek.



Gyártó:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

hu

A CÍMKÉKEN HASZNÁLT JELZÉSEK

Magyar HU							
	In Vitro Diagnosztikum	Katalógusban Szereplő Kód	Lot Szám	Figyelem, olvassa el a felhasználói útmutatót.	Hőmérséklet határok	Lejáratí Idő	Vizsgálatok Szám
	Gyártó	Óvja a Napfénytől	Gyártás Időpontja	Mikroplate	Pozitív kontroll	Negatív kontroll	Kalibrátor
	Konjugátum	Minta hígító	Szubsztrát TMB	Stop oldat (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Mosópuffer Koncentrárum 20x	Próbahígító	Rekonsztuáló x mL
	Biológiai kockázat	Veszély	Figyelem				

Figyelem!

A stop oldat osztályozása: Skin corr. 1A



- Figyelmeztetés:**
Veszély
- A címkézés veszélyt meghatározó összetevői:**
Kénsav
- Figyelmeztető mondatok:**
H314 Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz.
- Óvintézkedésre vonatkozó mondatok:**
P260 A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P303+P361+P353 HA BŐRRE (vagy hajra) KERÜL: Az összes szennyezett ruhadarabot azonnal el kell távolítani/le kell vetni. A bőrt le kell öblíteni vízzel/zuhanyozás.
P305+P351+P338 SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
P310 Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.
P405 Elzárva tárolandó.
P501 As edény tartalmát/a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

Figyelem!

A pozitív kontroll, a negatív kontroll, a kalibráló, a Konjugátum, a Minta hígító, a Minta hígító Mosópuffer Koncentrárum 20x osztályozása: Skin sens. 1



- Figyelmeztetés:**
Figyelem
- A címkézés veszélyt meghatározó összetevői:**
Keverék: 5-klór-2-metil-2H-izotiazolin-3-on [EC sz. 247-500-7]; 2-metil-2H-izotiazolin-3-on [EC sz. 220-239-6] (3:1)
- Figyelmeztető mondatok:**
H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.
- Óvintézkedésre vonatkozó mondatok:**
P261 Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P280 Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező..
P321 Különleges kezelés (lásd ezen a címkén).
P333+P313 Bőr érzékenység vagy repedés esetén: forduljon orvoshoz.
P302+P352 BŐRRE KERÜLÉSE ESETÉN: öblítse le bő vízzel.
P501 Az edény tartalmát/a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

A biztonsági kártyákra vonatkozó adatok a www.adaltis.net található.

A. HASZNÁLATI CÉL

Negyedik generációs, immunenzim teszt (ELISA) C hepatitisz antivírus antitestek humán plazmákban (EDTA, heparin és citrát) és szérumokban történő in vitro diagnosztikai kimutatására. HCV vírussal fertőzött páciensektől begyűjtött vérben levő antitestek meghatározására használható készlet.

Ez a kit in vitro diagnosztikai használatra alkalmas.

B. BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet (OMS) C hepatitisz vírus fertőzést a következőképpen határozza meg:

„A C hepatitisz a máj vírusos megbetegése, „nem A, nem B” hepatitiszként is számontartva, parenterálisan továbbítottan, az okozó ágens beazonosításáig 1989-ben. A C hepatitisz vírus felfedezése és jellemzése elvezet a poszt-transzfúziós hepatitiszek elsődleges szerepének és a perzisztencia fertőzések kiváltásában játszott irányultsága megértéséhez”.

A HCV alapvetően az emberi vérrel való érintkezés útján terjed. Világszerte a HCV alapvető okai a transfúziókhoz használt, a nem ellenőrzött vér és a nem megfelelően sterilizált tűk és fecskendők újrafelhasználása.

Jelenleg nincs védőoltás a C hepatitisz megelőzésre, a krónikus C hepatitisz kezelése túlságosan költséges ahhoz, hogy a fejlődő országok népessége felhasználhassa. Ennél fogva, globálisan tekintve, a C hepatitiszes betegekre tett legnagyobb hatás a HCV mozokomiális (vér transfúziók, nem biztonságos injekciók) transzmisszió kockázatok és nagy kockázatú magatartás (drog injekció) csökkentésére irányuló erőfeszítésekkel érhető el.

A C hepatitisz (HCV) vírus olyan vírus (A, B, C, D és E), ami az esetek többségében a vírusos hepatitiszért tehető felelőssé. Ez egy, a flaviviridae családból származó, monokatenáris RNS vírus korlátozott gazdasejt spektrummal rendelkezve. Kizárólag az emberek és a csimpánzok vannak kitéve a fertőzés veszélyének, és mindkét esetben azonos betegség alakul ki. A vírus lényeges jellemzője a relatív genom változékonyság, ami valószínű, a krónikus fertőzések kialakítási tendenciához (80%) kapcsolódik. A HCV különféle egyesül genotípusokkal, amelyek jelentősen meghatározhatják a betegség súlyosságát és a kezelésre való választ.

A HCV fertőzés lappangási ideje a klinikai szimptómák megjelenése előtt 15 és 150 nap közötti. Az akut szimptómák között a gyakoribbak a fáradtságérzet és a sárgaság, mindenképpen, az esetek többségében (60% és 70%), azok is, amelyek krónikus fertőzést mutatnak, aszimptotikusak. Az új, fertőzött betegek körülbelül 80% - krónikus fertőzött. A krónikus fertőzöttek 10 %-a és 20%-a cirrózis, ugyanakkor 20- 30 év közötti időtartam alatt, a krónikus fertőzöttek 1%-ában és 5%-ában fordul elő májdaganatos megbetegedés. A májdaganatos betegek többsége, akik nem B hepatitisz fertőzöttek, HCV vírus fertőzöttek. Még nem tisztázott a HCV vírus fertőzés májdaganat okozó mechanizmus. A C hepatitisz súlyosbítja a májbetegségeket egyéb hepatitisz

problémák esetén. Pontosabban, a májbetegség azon hepatitisz betegek esetén alakul ki gyorsabban, akik túlzott alkoholfogyasztók és HCV vírus fertőzöttek. A HCV vírus alapvetően a fertőzött vérrel való kontaktussal terjed. A transzmisszió a HCV vírus jelenlétének tesztelésére használt szerológiai nem kontrollált vértranszfúzió révén újrafelhasznált fecskendő, fecskendő és egyéb, nem megfelelően sterilizált, orvosi eszközök révén, vagy a droghasználók közötti fecskendő csere révén jól dokumentált. A transzmisszió bekövetkezhet nemi vagy perinatális úton, azonban ez ritkán fordul elő. Egyéb, transzmisszió módok nem a megfelelően sterilizált eszközök használata esetén, viselkedési, társadalmi, kulturális szokásokhoz (body piercing, körülmelés és tetoválás) kapcsolódnak. A HCV nem terjed tüsszentés, testi érintkezés, köhögés, étel, víz, evőeszköz vagy ivóeszköz megosztás, vagy alkalmasszerű érintkezés esetén.

Úgy a fejlett országokban, mint a fejlődő országokban a nagy kockázatú csoportokba a befecskendezhető drogok használói, a szerológiai nem kontrollált vér befogadók, a hemofíliás, a dialízises és védekezés nélkül kockázatos nemi életet folytató tartoznak. A becslések szerint a fejlett országokban a krónikus HCV vírus fertőzött betegek 90%-a alapvetően az injekciós droghasználók és a szerológiai nem kontrollált vért vagy vérkészítményt kapott személyek. A fejlődő országok többségében, ahol még mindig használatban van szerológiai nem kontrollált vér és vérkészítmény az alapvető transzmissziós eszközök a nem sterilizált injekciók és a szerológiai nem ellenőrzött vértranszfúzió. Ugyanakkor az áldozati rítusokat és körülmelést gyakoroló személyek is kockázat csoportok, amennyiben nem sterilizált fém eszközöket használnak vagy újrafelhasználják azokat.

Az OMS becslése szerint körülbelül 170 millió személy, vagyis a világ népesség 3% -a HCV vírus fertőzött és ki van téve a cirrózis és/vagy májdaganat megbetegedés veszélyének. A HCV fertőzés túlsúlya sokkal nagyobb Afrikában, Közép-Keleten, Dél-Kelet Ázsiában és a Csendes óceán nyugati részén levő országokban mint Észak- Amerikában és Európában.

A HCV diagnosztikai tesztek a fertőzés megelőzésére szolgálnak a vér-, és vérplazma adók screening-je révén a klinikai diagnózis és a beteg megfelelő gyógyítására vonatkozó döntések meghatározása céljából. A jelenleg rendelkezésre álló, diagnosztikai tesztek a HCV, specifikus antitestek mérésére szolgáló immunenzim (EIA) adagoláson alapulnak. Az EIA rendszer a a krónikus fertőzött betegek több mint 95%-át és az akut fertőzöttek 50%-át és 70% -át képes mérni. HCV egyedi antigénnel reakcióba lépő antitestazonosító, rekombinációs immunoblot minta (RIBA) gyakran használt a pozitív EIA eredmény megerősítő, kiegészítő tesztek esetén. Szintén használatosak a RNS megerősítésen alapuló HCV tesztek (pl., PCR, kötött DNA minta) a szerológiai eredmény megerősítésére és a hatékony antivírus terápia megállapítására. A pozitív eredmény aktív fertőzés jelenlétét és a fertőzés kiterjedésének és/vagy krónikus májbetegségek kialakulásának lehetőségét bizonyítja.

A krónikus C hepatitiszes betegek kezelésére egyedi vagy ribavirin-nel kombinált interferon antivírus

gyógyszerek használhatók, annak ellenére, hogy a kezelés nagyon magas költségekkel jár. Az egyedi interferon kezelés a betegek körülbelül csak 10%- 20%-a esetén hatékony. Ribavirin-el kombinált interferon az esetek 30%- 50%-a esetén hatékony. A ribavirin nem hatékony egyedi adagolás esetén.

Nem áll rendelkezésre hatékony HCV elleni oltás. A kutatások az oltóanyag előállítását célozzák, de a HCV genom komplikációkat okoz az oltóanyag előállításában. A HCV vírus fertőzést követő immun-védelmi válasz hiánya hátráltatja az oltóanyag kutatást. Még azt sem ismerjük, hogy az immunrendszer képes-e a vírus kikerülésére.

Ugyanakkor, néhány kutatás bizonyította a HCV fertőzött betegek körében vírussemlegesítő antitestek jelenlétét. Oltóanyag hiányában szükség van az összes, fertőzésmegelőzési óvintézkedésre, (a) vér-, és szerv screening és tesztre; (b) vírus aktiválására a plazmákban és a származékokban; (c) az egészségügyi gyakorlatban a protokollok során fertőzés ellenőrző gyakorlat növelése és fenntartása, úgy mint, az orvosi és fogászati eszközök megfelelő sterilizálására; (d) a közemberek és az egészségügyi személyzet közötti kapcsolat megváltoztatásának promoválására az injekciók túlzott használatának csökkentése és biztonságos injekciók használata révén; (e) a droghasználók és nagy kockázatú, szexuális életet folytató személyek kockázati faktorai csökkentésére.

A genom atrukturális alkotók esetén kódolja a nukleokapszid fehérjét és a víruskapszid glikoproteint, és a vírus replikációban és a fehérjefeldolgozásban érintett, funkcionális alkotókat. Úgy tűnik a nukleokapszid kódoló terület a világszerte a legkonzervatívabb a létrehozott izoláltak közül.

C. A TESZT ELVE

A microplate specifikus HCV antigénekkal fedettek, amelyek az immunológiailag domináns konzerválókat és determináns antigéneket (Core peptid, rekombináns NS3, NS4 és NS5 peptidek) kódoló „core” és „ns” területekből származnak.

A szilárd fázis előbb hígított mintával kezelt, és ha a HCV antitestek jelen vannak, a Stop antigénekhez kötődnek. A minta, összes, egyéb komponensei mosása után a második inkubáció során a HCV antitestek kötődése után IgG és IgM antitesteket észleltek a peroxidokkal (HRP) megkülönböztetett specifikus anti- IgG&M poliklónozási antitestekkel ellátott Konjugátum hozzáadása révén.

A szilárd bázisra befogott enzim a TMB szubsztrát keverékre reagálva, optikai jelzést generál, ami a mintában jelenlevő anti HCV antitestek mennyiségéhez aránylik. A cut-off érték lehetővé teszi a HCV antitestek pozitív és negatív eredményein az optikai denzitás értelmezését.

D. KOMPONENSEK

A kit tartalmaz reagenseket 96 teszthez (071067 kód), vagy 192 teszthez (071064 kód), vagy 480 teszthez (071068 kód).

Microplate	1
Negatív kontroll	1x4 mL/flakon
Pozitív kontroll	1x2 mL/flakon
Kalibrátor	2 flakon
Konc. mosó oldat 20x	1x50 mL/flakon
Konjugátum	1x16 mL/flakon
Minta hígító	1x50 mL/flakon
TMB szubsztrát	1x16 mL/flakon
Stop oldat	1x15 mL/flakon
Próbahígító	1x8 mL/flakon
Lemezborító lap	2
Tesztek száma	96
Kód	071067

Microplate	2
Negatív kontroll	2x4 mL/flakon
Pozitív kontroll	1x4 mL/flakon
Kalibráló	3 flakon
Konc. mosó oldat 20x	2x50 mL/flakon
Konjugátum	2x16 mL/flakon
Minta hígító	2x50 mL/flakon
TMB szubsztrát	2x16 mL/flakon
Stop oldat	2x15 mL/flakon
Próbahígító	2x8 mL/flakon
Plate Zárófóliák	4
Tesztek száma	192
Kód	071064

Microplate	5
Negatív kontroll	1x20 mL/flakon
Pozitív kontroll	1x10 mL/flakon
Kalibráló	7 flakon
Konc. mosó oldat 20x	5x50 mL/flakon
Konjugátum	2x40 mL/flakon
Minta hígító	5x50 mL/flakon
TMB szubsztrát	2x40 mL/flakon
Stop oldat	2x40 mL/flakon
Próbahígító	1x40 mL/flakon
Plate Zárófóliák	10
Tesztek száma	480
Kód	071068

1. Microplate

12 csík, 8 mikrocella Core peptiddel, amelyek bevontak NS3 peptid rekombináloval, NS4 és NS5 peptidekkel. A plate-k alumínium tasakba vannak csomagolva deszikkánsal együtt.

Vigye a mikroplate-t szobahőmérsékletre (+18...24°C) a zacskó kinyitása előtt. A használatlan csíkokat vissza kell tenni a zacskóba, azt visszazárni és továbbra is +2...8°C között tárolni deszikkánsal együtt.

2. Negatív kontroll

Használatra kész kontroll. 10 mM, 6.0 ± 0.1, 2% Na-citrát oldat puffert, 2% alap proteint, 0.1% Proclin 150 kazeint tartalmaz mint tartósítószer. A negatív kontrollt olajzöld szín jelzi.

3. Pozitív kontroll

Használatra kész kontroll. Tartalmaz 1% kecske szérum fehérjét, pozitív humán HCV vírus antitesteket, 10 mM, pH 6.0±0.1, Na-citrát puffert, 0.5% Tween 20-ast, 0.09% Na-azidot, 0.1% Proclin 150-t mint tartósítószer. A pozitív kontrollt olajzöld szín jelzi.

Fontos megjegyzés: Élő patogének hiánya a pozitív kontrollban nem teljesen zárható ki, ezáltal a kontrollt

potenciálisan veszélyesként kell kezelni, a GLP-vel összhangban.

4. Kalibráló

Liofilizált kalibráló. A címkén jelzett EIA jelzésű vízmennyiségben kell feloldani. Tartalmaz magzati borjú szérumot, HCV vírusra pozitív humán antitesteket, 06/188-006 Munka szabvány NIBSC kód értelmében kalibrált tartalommal, 10mM, pH 6.0±0.1 Na-citrát puffert, 0.3 mg/mL szulfát gentamicin puffert és 0.1% Proclin 150 mint tartósítószer.

Fontos megjegyzés: Élő patogének hiánya a kalibrálóban nem teljesen zárható ki, ezáltal a reagenst potenciálisan veszélyesként kell kezelni, a GLP-vel összhangban.

Megjegyzések: a fiola tartalma feloldásához szükséges mennyiség tételenként változhat. Kérjük, használja a címkén jelzett, szabályos mennyiséget.

5. Koncentrált mosó oldat 20x

Koncentrált oldat 20x. Hígítás után a mosó oldat (hígított mosó puffer) 10 mM, pH 7.0 ± 0.2 foszfát puffert, 0.05% Tween 20-at és 0.05% Proclin 150-t tartalmaz mint tartósítószer.

Hígítás után a mosó oldat stabil marad 1 hétig 2 és 8°C közötti hőmérsékleten.

6. Konjugátum

Vörös színű, használatra kész és kódolt reagens. Tartalmaz humán IgG és IgM-el kecske poliklónozott antitestekkel peroxid-rafánt, 5% BSA-t, 10 mM, pH 6.4 ± 0.1 citrát puffert, 0.1% Proclin és 0.05% Tween 20-at mint tartósítószer.

7. TMB szubsztrát

Használatra kész komponens. Tartalmaz 50 mM, pH 3.5-3.8 citrát-foszfát puffert, 4% dimetil-szulfátot, 0.03% tetrametil- benzidint (TMB) és 0.02% hidrogén peroxidot (H₂O₂). Használat előtt enyhén felrázandó.

Megjegyzés: Fénytől védve tárolandó mivel erős sugárzásra érzékeny.

8. Minta hígító

Használatra kész komponens. Kecskéi szérumot, Tris 10mM, pH 8.0±0.1 tamponált oldatot tartalmaz, ami 0.1% Proclin 150-t és 0.09% Na-azidot tartalmaz mint előkezelés és lemez kontroll céljából, interferencia blokkolással.

9. Stop oldat

Használatra kész komponens.

0.3 M H₂SO₄ oldatot tartalmaz. Használat előtt enyhén felrázandó.

10. Próba hígító

Zöld színű, használatra kész és kódolt komponens. Tartalmaz 1% kazeint, 10 mM, pH 6.0 ± 0.1 Na-citrát puffert és 0.1% Proclin 150-t mint tartósítószer.

Próba hígításra használható.

Megjegyzés: a hígító a próba jelenlétében olajzöld színről sötét kékeszöld színre vált.

E. SZÜKSÉGES, DE A KIT ÁLTAL NEM TARTALMAZOTT ANYAGOK

1. Kalibrált mikropipetták 200 µL és 10 µL és eldobható műanyag hegyek.
2. EIA szintű víz (duplán desztillált vagy deionizált, szén kezelt fertőtlenítőként használt oxidáló vegyületek eltávolítására).
3. Mérőóra 60 perces vagy hosszabb tartománnyal.
4. Absorbens papírtörlek.
5. Kalibrált ELISA mikroplate termosztatikus inkubátor (száraz vagy nedves) beállítva +37°C-nál.
6. Kalibrált ELISA mikroszűrő reader 450 nm (leolvasás) és ha lehetséges a fehér szín érzékelésére való, 620-630nm filterekkel.
7. Kalibrált ELISA mikroplate mosó.
8. Vortex vagy hasonló keverő eszközök.

F. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ELŐVIGYÁZATOSSÁG

1. A kitet képzett és megfelelően betanított személyzet használhatja csak a laboratóriumért felelős orvos felügyelete alatt. Ezt a használati útmutatót figyelmesen el kell olvasni a termék használatát megelőzően és szigorúan tartsa be a jelenlevő utasításokat.
2. A termék használata előtt olvassa el figyelmesen a biztonsági adatlapot (SDS).
3. Véregység és vérkészítmény screening-re való használat esetén a kitet ezen terület nemzeti hatósága (Eü. Minisztérium vagy hasonló hatóság) által bizonylatolt és minősített laboratóriumban kell használni ezen típusú vizsgálat kivitelezéséhez.
4. A teszt kivitelezésében részt vevő személyzetnek laboratóriumi védőruhát, por-mentes kesztyűt és szemüveget kell viselnie. El kell kerülni éles/hegyes (tüsk) vagy vágó (pengék) eszközök használatát. A teljes személyzetet képezni kell biobiztonság tekintetében, ahogy az a Center for Disease Control, Atlanta, U.S. ajánlja és le van írva a következő National Institute of Health's publication-ban: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. A mintakezelésbe bevont teljes személyzetet be kell oltani HBV-ra és HAV-ra, amelyre vakcinák elérhetőek, biztonságosak és hatékonyak.
6. A laboratóriumi környezetet ellenőrizni kell, elkerülendő olyan kontaminációkat, mint por, lebegő mikrobiális részecskék a kit fioláinak és mikroplate-inek nyitásakor, és a teszt végzésekor. Védje a szubsztrát TMB-t (TMB & H₂O₂) erős fénytől és kerülje el a munkafelület rázkódását a teszt elvégzésének helyén.
7. Előírat alapján a kitet +2...8°C között tárolja hőmérséklet-ellenőrzött hűtőben vagy hidegszobában.
8. Ne keverje a különböző sarzsorszámú kit komponenseket. Ajánlott, hogy a két kit között az azonos sarzsorszámú komponenseket se keverje össze.
9. Ellenőrizze, hogy a reagensek tiszták-e, és nem tartalmaznak látható nehéz részecskéket vagy aggregátumokat. Amennyiben ez nem megfelelő javasolja a laboratórium felügyelőjének, hogy intézze a kit cseréjét.
10. Kerülje el a szérum/plazma kereszt-kontaminációt eldobható pipettahegyek használatával és azok cseréjével minden minta után.

11. Kerülje el a kereszt-kontaminációt a kit reagensek között eldobható pipettahegyek használatával és azok cseréjével mindegyiknek a használata után.
12. Ne használja a kitet a külső (kartondoboz/másodlagos konténer) és belső (fiolák) címkéken feltüntetett lejárati idő után.
13. Minden mintát potenciálisan fertőzőtként kezeljen. Minden human szérummintát Biosafety Level 2-n kell kezelni, mint azt a Center for Disease Control, Atlanta, U.S. ajánlja egyetértésben azzal, ami jelente van az Institutes of Health's következő publikációjában: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. Eldobható műanyag áru használata ajánlott a mosóoldat elkészítésénél vagy a komponensek automata munkaállványban másik tartóba való átvitelénél a kontamináció elkerülésének céljából.
15. A kit használatát során képződött hulladékot a nemzeti irányvonalaknak és a kémiai és biológiai természetű laboratóriumi hulladékokra vonatkozó szabályzóknak megfelelően kell megsemmisíteni. Főleg a mosási folyamatból, a kontrolllok és minták maradványából származó folyadék-hulladékot kell potenciálisan fertőző anyagként kezelni és inaktiválni. Az inaktiváció javasolt folyamatai a kezelés 10%-os végkoncentrációjú háztartási fehérítővel 16-18 órán keresztül vagy hőinaktiválás autoklávban 121°C-on, 20 percig.
16. A véletlenszerű kifröccsenéseket házi fehérítővel átitatott papírtörülkövel fel kell itatni, majd vízzel lemosni. A törölközt ezután meg kell semmisíteni a laboratóriumi/kórházi hulladékhoz kijelölt megfelelő konténerek segítségével.
17. A Stop oldat 0,3M kénsavat tartalmaz. Kerülje a bőrrel és szemmel való érintkezést. Kontakt esetében, öblítse ki azonnal nagy mennyiségű vízzel.
18. Nátrium azid vagy konzerváló tiomerzál tartalmú reagenseket a felhasználói országban érvényes törvények által meghatározott előírások értelmében kezelje. Nátrium azid tartalmú oldatok eltávolítása esetén azonnal öblítse le bő vízzel. Vegye figyelembe azt a tényt, hogy a nátrium azid robbanékony elegyet képez ólom és vörösréz tartós jelenlétében.
19. Ne dohányozzon, egyen igyon vagy ne alkalmazzon kozmetikumokat azon a területen, ahol a mintákat vagy a kit reagenseket használja.
20. Más hulladék anyagokat, amelyek a kit használata során keletkeznek (pl. mintákhoz és kontrolllokhoz használt pipettahegyek, használt mikroplate-k) potenciálisan fertőzőként kell kezelni és a nemzeti szabályzók és laboratóriumi hulladékokra vonatkozó előírások alapján meg kell semmisíteni.
21. Ne pipettázzon szájjal.

G. MINTA: ELŐKÉSZÍTÉS ÉS JAVASLATOK

1. A vért aseptikusan vénapunkcióval kell venni, és a plazmát vagy szérumot a klinikai laboratóriumi analízishez használt mintapreparálási technikák alapján kell előkészíteni. Nem észlelhető különbség a citráts, EDTA-s és heparinos mintaelőkészítések között.

2. Kerülje el bármilyen tartóítószer hozzáadását a mintákhoz, különösen a nátrium-azidot, mivel ez a vegyszer befolyásolná a konjugátum enzimátikus aktivitását, fals negative eredményeket okozván.
3. A mintákat egyértelműen azonosítani kell kódokkal vagy nevekkkel, acélból, hogy az eredmények helytelen értékelése elkerülhető legyen. Ha a kit véregységek tesztelésére szolgál, a bárkód jelölés és a leolvasás erőteljesen ajánlott.
4. Hemolizált (piros) és láthatóan hyperlipémiás ("tejszerű") mintákat meg kell semmisíteni, mivel azok fals eredményeket generálhatnak. Fibrin vagy nehéz részecskéket vagy mikrobiális filamentumokat és testeket tartalmazó mintákat meg kell semmisíteni, mivel azok fals eredményekhez vezethetnek.
5. A szérumot és a plazmát +2...8°C között lehet tárolni maximálisan a gyűjtést követő 5 napon keresztül. Hosszabb tárolási időszak esetén a mintákat fagyasztva -20°C-n több hónapig lehet tárolni. Bármely fagyasztott mintát csak egyszer szabad lefagyasztani, mivel a többszöri fagaszttás esetén részecskéket generálódhatnak, amely befolyásolhatja a teszteredményt.
6. Ha partikulumok vannak jelen, centrifugálja 2.000 rpm-n 20 percig vagy szűrjön 0.2-0.8µm filterek használatával, hogy feltisztítsa a mintát a teszteléshez.

H. A KOMPONENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

Nyitott kittel végzett tanulmányok nem mutattak ki semmiféle releváns aktivitás-vesztést 6 hónapig.

1. Microplate:

Engedje, hogy a mikroplate elérje a szobahőmérsékletet (kb. 1 óra) mielőtt kinyitja a tartóját.. Ellenőrizze, hogy a nedvességszívó nem színeződött el sötét zöldre, ami jelzi a hibás tartósítást. Ebben az esetben hívja az Adaltis ügyfél szolgálatot.

A fel nem használt csíkokat vissza kell helyezni az alumínium tasakba szorosan visszazárva és +2...8°C között tárolva.

Első alkalommal történő kinyitáskor a maradvány csíkok stabilak két hónapig, vagy addig, amíg a nedvesség-indikátor a deszikkáns tasakon belül sárgáról zöldre nem változik.

2. Negatív kontroll:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

3. Pozitív kontroll:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Ezt a komponenst potenciálisan fertőzőként kezelje.

4. Mérőszköz:

Gondosan oldja fel a fiole liofilizált tartalmát a saját címkéjén látható módon, EIA tisztaságú vízzel. Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Ezt a komponenst potenciálisan fertőzőként kezelje.

Megjegyzés: feloldás esetén a kalibráló már nem stabil.
–20°C hőmérsékleten tartandó.

5. Koncentrált mosó oldat 20x:

(50 mL -es flakon):

A 20x koncentrált oldat belső tartalma bidesztillált vízben hígítandó 1000 mL-ig (a mennyiség a címkén látható) és finoman keverendő használat előtt. Ahogy kristályok vannak jelen a fiolában figyeljen arra, hogy az egész tartalmat feloldja az oldat készítésekor.

Az előkészítésben kerülje el a habosodást, mivel buborékok jelenléte rossz mosási hatásokhoz vezethet.

Megjegyzés: Ha már fel van oldva, a mosóoldat stabil 6 napig +2...8°C között.

6. Konjugátum:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Legyen óvatos, hogy ne szennyezze a folyadékot oxidáló vegyületekkel, levegő-szállított porral vagy mikrobákkal.

Ha a komponenst transzferálni kell, csak műanyag lehetőség szerint steril, eldobható konténert használjon.

7. TMB szubsztrát:

Használatra kész komponens.

Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Legyen óvatos, hogy ne szennyezze a folyadékot oxidáló vegyületekkel, levegő-szállított porral vagy mikrobákkal.

Ne tegye ki erős besugárzásnak, oxidáló ágenseknek és fém felszíneknek.

Ha ezt a komponenst transzferálni kell, csak műanyag lehetőség szerint steril, eldobható konténert használjon.

8. Minta hígító:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

9. Stop oldat:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

10. Próbahígító:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

I. KÉSZÜLÉKEK ÉS ESZKÖZÖK A KIT HASZNÁLATÁVAL KAPCSOLATOSAN

1. A mikropipettákat kalibrálni kell, hogy az assay által megkívánt korrekt térfogatot szállítsák és rendszeres dekontaminációnak kell alávetni azokat (háztartási alkohol, 10%-os fehérítő oldat, Kórház-szintű fertőtlenítőszer) a részeket, amelyek véletlenszerűen kontaktálódhatnak a mintával. Rendszeresen karban is kell őket tartani. A kifröccsenések és kit komponensek maradékainak dekontaminálását is rendszeresen el kell végezni. Szintén rendszeres karbantartás kell ahhoz, hogy 1% precizitást és $\pm 2\%$ eltérést mutassanak.
2. Az ELISA inkubátort +37°C-re kell beállítani ($\pm 0.5^\circ\text{C}$ toleranciával) és rendszeresen megbizonyosodni arról, hogy tartja a korrekt hőmérsékletet. Mind száraz inkubátorok, mind vízfürdők alkalmasak az inkubáláshoz, amennyiben a készülék validált ELISA tesztek inkubálására.
3. Az ELISA mosó is extrém módon fontos az assay teljes kivitelezéséhez. A mosót óvatosan kell validálni és megfelelően optimalizálni kit kontrolllok és referencia panelek használatával a kitnek a rutin laboratóriumi tesztek során történő használata előtt.

Rendszerint 4-5 mosóciklus (350 μL /cső mosóoldat felszívás + kiengedés = 1 ciklus) elegendő arról megbizonyosodni, hogy a teszt kivitelezése elvárás szerinti. Javasolt 20-30 másodperc áztatási intervallum betartása a ciklusok között. Acélból, hogy azok száma megfelelően beállítható legyen, ajánlott egy assay futtatása a kit kontrolllokkal és jól karakterizált negatív és pozitív referencia mintákkal, és annak ellenőrzésével, hogy az értékek illeszkednek-e az alábbi, "Belső minőségellenőrzés" fejezetben jelentettekkel. A szállított térfogatok kalibrációját és a mosó karbantartását (dekontamináció és a tűk tisztítása) a gyártó utasításai alapján kell elvégezni.

4. Az inkubációs időknél van egy $\pm 5\%$ -os toleranciája.
 - ✓ Rövid inkubáció módszer (az 1./2. inkubációra a tolerancia 43 perc és 47 perc közötti; a 3. inkubációra a tolerancia 14 perc és 16 perc közötti).
 - ✓ Standard inkubáció módszer (az 1. inkubációra a tolerancia 57 perc és 63 perc közötti.; a 2. és a 3. inkubációra a tolerancia 29 és 31 perc közötti).
5. Az ELISA mikroplate readert 450 nm-es leolvasófilterrel kell szállítani és ideálisan egy másik filterrel (620-630nm) blankolási célokhoz. A standard kivitelezéseknek a következőknek kell lenniük: (a) sáv szélesség $\leq 10\text{nm}$; (b) abszorbancia tartomány 0 tól ≥ 2.0 ; (c) linearitás ≥ 2.0 -ig; (d) ismételhetőség $\geq 1\%$. A blankolást az "Eljárás menete" fejezetben azonosított csövecskén kell elvégezni. A reader optikai rendszerét rendszeresen kell kalibrálni, hogy megbizonyosodjon a megfelelő optikai denzitás mérésében. Ezt rendszeresen karban kell tartani a gyártó utasításai alapján.
6. Az ELISA automatizált munkapult kit használata esetén az összes kritikus lépés (diszpenzáció, inkubáció, mosás, leolvasás, adatkezelés) gondosan ellenőrizendő, kalibrálandó és rendszeresen elrendezendő az O Belső minőség kontroll című részekben jelenlévő értékekkel való megfelelés megőrzésére. A próba protokoll az egység működési rendszerébe installálandó és engedélyezve kell lennie a mosóhoz és a leolvasóhoz. Mi több, a folyékony komponenseket mozgó leálló résznek (diszpenzáció és mosás) engedélyezettnek és szabályosan beállítottaknak kell lennie. Főként, nagyon gondosan el kell kerülnie a használt tűk közé becsípődést a diszpenzáció és a mosás esetén. Alaposan tanulmányozza és ellenőrizze a közeli sejtszennyeződés lehetőségének minimálisra csökkentése céljából. Az ELISA automatizált munkapultok használata akkor javasolt a vér screening-hez, amikor a tesztelendő minták száma nagyobb mint 20-30 munkaszakasz egység.

L. TESZT ELŐTTI KONTROLLOK ÉS TEVÉKENYSÉGEK

1. Ellenőrizze a kit lejárati idejét, amely a külső címkére van nyomtatva. Ne használja az eszközt, ha lejárt.
2. Ellenőrizze, hogy a folyékony komponensek nem kontaminálódtak-e látható részecskékkel vagy aggregátumokkal. Ellenőrizze, hogy a Szubsztrát szintelen vagy halvány kék, úgy, hogy felszívja azt steril műanyag pipettával. Ellenőrizze, hogy nem tört

- össze semmi sem a szállítás során és nincs kifröccsent folyadék a dobozon belül. Ellenőrizze, hogy az alumínium tasak, amely a mikroplate-t tartalmazza és nincs megszúrva és nem károsodott
3. Higítsa meg a 20x koncentrált mosópuffer teljes mennyiségét a fentiekben leírtak szerint.
 4. Higítsa meg a Kalibrálót, mint az fent le van írva.
 5. Engedje, hogy mindegyik komponens elérje a szobahőmérsékletet (kb. 1 óra) és aztán finoman keverje meg vortexen az összes folyékony reagenst a leírás szerint.
 6. Állítsa be az ELISA inkubátort $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ -ra és készítse elő az ELISA mosót a hígított mosóoldatos priming-gal a gyártói utasítások szerint. Állítsa be a mosóciklusok pontos számát, ahogy az I.3 részben található.
 7. Ellenőrizze, hogy az ELISA reader be van kapcsolva és bizonyosodjon meg arról, hogy legalább 20 perccel a leolvasás előtt be let kapcsolva.
 8. Automata munkaállomást használva kapcsolja be, ellenőrizze a beállításokat és legyen biztos abban, hogy a helyes protokollt használja,
 9. Ellenőrizze, hogy a mikropipetták a kívánt értékre vannak beállítva.
 10. Ellenőrizze, hogy minden más készülék rendelkezésre áll és használatra kész.
 11. Problémák esetén ne dolgozzon tovább a teszttel és kérve a supervisor tanácsát,

M. AZ ELJÁRÁS MENETE

A próbát az alábbiakban leírtak szerint kell elvégezni, figyelve arra, hogy mindegyik mintánál ugyanazon inkubációs időt tartsuk be.

A próba két inkubációs eljárással valósítható meg: Válassza ki a saját szabályozásnak megfelelőt:

1. Standard inkubáció az (1^{a} inkubációra 60 perc, a 2^{a} és a 3^{a} inkubációra 30 perc)
2. Rövid inkubáció (az 1^{a} és a 2^{a} inkubációra 45 perc, a 3^{a} inkubációra 15 perc)

1. Standard inkubáció - Kézi próba:

1. Helyezze a kívánt mennyiségű csövecskét a csövecske tartóba. Hagyja az 1. csövecskét üresen a blank részére.
2. Tegyen be 200 μL háromszoros feloldott negatív kontroll mennyiséget, 200 μL kétszeresen feloldott a kalibrálót és 200 μL egyszer feloldott a pozitív kontroll mennyiséget a közeli csövecskékbe. Az kontrollerek és a kalibráló nem igényel hígítást, már előhígított állapotban használatra készek!
3. Adjon hozzá 200 μL minta hígítót a minta csövecskébe, majd oldjon fel 10 μL mintát minden egyes, szabályosan beazonosított csövecskébe. Enyhén rázza meg a lemezt elkerülve a közeli csövecskék kifolyását és szennyezését a minta teljes oldása céljából a saját hígítójában.

Fontos megjegyzések: Ellenőrizze a minta hígító színét, a minta hozzáadása után ennek világos zöldről sötét kékeszöldre kell válnia jelezve, hogy a minta hozzáadás megtörtént.

4. Oldjon fel 50 μL próba hígítót az ellenőrzők/kalibrálók és minták összes csövecskébe. Ellenőrizze, hogy a minták színe sötét kék.

5. Inkubálja a mikroplate-t **60 percig $+37^{\circ}\text{C}$ -on**. Fontos megjegyzés: a csíkok a készlethez tartozó, megfelelő tapadólappal borítandók kizárólag kézzel végzett teszt esetén. A csíkok nem fedhetők be automatizált ELISA eszköz használata esetén.
6. Mossa a Microplatet automata mosóegységgel 350 μL /hígított mosóoldat csövecske meghagyásával és szívásával az I.3. részben előírt módon.
7. Pipettázzon 100 μL enzim társítót mindegyik csövecskébe kivéve a blank csövecskéket, és fedje le a fóliával. Ellenőrizze, hogy ez a vörös színű komponens az összes csövecskében fel van oldva, kivéve az A1 kamrát.

Fontos megjegyzés: ügyeljen arra, hogy ne üsse meg a társítóval telített hegygel a csövecske belső műanyag felületét. Kontamináció következhet be.

8. Inkubálja a Microplat-et **30 percig $+37^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten**.
9. Öblítse le a csövecskéket az I.3. részben leírt módon.
10. Pipettázzon 100 μL TMB szubsztrát keveréket az összes csövecskébe és blank csövecskébe is. Inkubálja a Microplatet **a környezeti hőmérsékleten ($18-24^{\circ}\text{C}$) 30 percig**.

Fontos megjegyzés: Ne tegye ki erős sugárzásnak. Magas háttér generálódhat.

11. Pipettázzon 100 μL Stop oldatot bármelyik részbe a 10. pontban leírt sorrendben az enzim reakció leállítására végett. A Stop oldat hozzáadása a pozitív kontrollereket és a negatív kontrollereket kékről sárgára fogja megváltoztatni.
12. Mérje meg az oldat színintenzitását minden kamrában az I.5. részben leírt módon, 450 nm reader filterrel és lehetőleg, 620-630nm filterrel a Microplate A1 pozícióban levő, blank eljárás esetén.

Fontos megjegyzések:

1. Ha a második filter nem áll rendelkezésre, bizonyosodjon meg arról, hogy a mikrocső alján nincs ujjlenyomat a 450 nm-es leolvasás előtt. Az ujjlenyomatok fals pozitív eredményeket okozhatnak a leolvasásánál.
2. A leolvasást ideálisan a Stop oldat hozzáadását követően, azonnal meg kell tenni, de nem később, mint 30 perccel azután. A kromogénnek néminemű ön-oxidációja jöhet létre a magas háttér miatt.
3. 350 ± 150 rpm rázás az inkubáció során körülbelül 20% adagolás szenzibilitást mutatott.

2. Rövid inkubáció - Kézi próba:

1. Helyezze a kívánt mennyiségű csövecskét a csövecske tartóba. Hagyja az 1. csövecskét üresen a blank részére.
2. Adjon 200 μL m negatív kontrollt triplikátumban, 200 μL kalibrálót duplikátumban és 200 μL pozitív kontrollt unikátumban a közeli csövecskébe felpipettázva és leengedve homogenizálás céljából. Az kontrollerek és a kalibráló nem igényel hígítást, már előhígított állapotban használatra készek!

- Adjon 200 µL minta hígítót a minta összes csövecskéjébe, majd oldjon fel 10 µL mintát minden egyes, szabályosan beazonosított csövecskébe. Rázza meg finoman elkerülve a túlfolyást és a további csövecskék kontaminációját.

Fontos megjegyzések: ellenőrizze a minta hígító színét, a minta hozzáadása után ennek világos zöldről sötét kékeszöldre kell váltania jelezve, hogy a minta hozzáadás megtörtént.

- Oldjon fel 50 µL próba hígítót a kontrollok/kalibrálók és minták összes csövecskéjébe. Ellenőrizze, hogy a minták színe sötétkék.
- Inkubálja a Microplatet **45 percig +37°C hőmérsékleten**.
Fontos megjegyzés: Fedje le csíkokat biztonságosan mikroplate fedővel kézzel végzett teszt esetén. A csíkok nem fedhetők le az automatizált ELISA eszköz használata esetén.
- Öblítse le a Microplate-t automata mosóegységgel 350 µL/hígított mosóoldat csövecske meghagyásával és szívásával az I.3. részben előírt módon.
- Pipettázzon 100 µL enzim társítót az összes csövecskébe kivéve a blank-et és fedje le a tapadó lappal. Ellenőrizze, hogy ez a vörös színű komponens az összes csövecskében fel van oldva, kivéve az A1 -et.

Fontos megjegyzések: Legyen óvatos, hogy ne érintse a csövecske műanyag belső felületét a konjugátummal töltött pipettahegygel. Kontamináció jelentkezhet.

- Inkubálja a Microplatet **45 percig +37°C hőmérsékleten**.
- Öblítse le a csövecskéket az I.3. részben leírt módon.
- Pipettázzon 100 µL TMB szubsztrát keveréket az összes csövecskébe és a blank-be is. Inkubálja a Microplatet környezeti hőmérsékleten (18-24°C) **15 percig**.

Fontos megjegyzések: Ne tegye ki erős sugárzásnak. Magas háttér generálódhat.

- Pipettázzon 100 µL Stop oldatot bármelyik részbe a 10. pontban leírt sorrendben az enzim reakció leállítása végett. A Stop oldat hozzáadása a pozitív kontrollokat és a pozitív mintákat kékről sárgára fogja megváltoztatni.
- Mérje meg az oldat színintenzitását minden csövecskében az 1.5. részben leírt módon, 450 nm reading filterrel és lehetőleg, 620-630nm filterrel a Microplate A1 pozícióban levő, blank eljárás esetén.

Fontos megjegyzések:

- Ha a második filter nem áll rendelkezésre, bizonyosodjon meg arról, hogy a mikrocső alján nincs ujjlenyomat a 450 nm-es leolvasás előtt. Az ujjlenyomatok fals pozitív eredményeket okozhatnak a leolvasásánál.
- A leolvasást ideálisan a Stop oldat hozzáadását követően, azonnal meg kell tenni, de nem később, mint 30 perccel azután. A kromogénnek néminemű ön-oxidációja jöhet létre a magas háttér miatt.

- 350 ± 150 rpm rázás az inkubáció során körülbelül 20% adagolás szenzibilitást mutatott.

N. TESZTSÉMA

Módszer	Műveletek (Standard inkubáció)	Műveletek (Rövid műveletek)
Kontrollok és Kalibráló	200 µL	200 µL
Minta hígító és minta	200 µL hígító+ 10 µL minta	200 µL hígító+ 10 µL minta
Próba hígító	50 µL	50 µL
1a inkubáció	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Hőmérséklet	+37°C	+37°C
Mosás	4-5 ciklus	4-5 ciklus
Enzimes Konjugátum	100 µL	100 µL
2a inkubáció	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Hőmérséklet	+37°C	+37°C
Mosás	4-5 ciklus	4-5 ciklus
TMB szubsztrát	100 µL	100 µL
3a inkubáció	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Hőmérséklet	Környezeti hőmérséklet (18...24°C)	Környezeti hőmérséklet (18...24°C)
Stop oldat	100 µL	100 µL
OD leolvasás	450/620nm	450/620nm

A diszpenzációs séma mintáját mutatja az alábbi táblázat:

(mindkét inkubáció eljárásra érvényes):

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Jelmagyarázat: BLK = Fehér NC = Negatív kontroll
CAL = Kalibráló PC = Pozitív kontroll S = Minta

O. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Ellenőrzést kell végezni a a kontrolllokon és a kalibrátoron mindenkor, amikor verifikálni szükséges, hogy a várt OD450/620 nm értékek beleillenek-e a vizsgálatba a táblázatban látható módon.

Ellenőrzés	Követelmények
Blank	< 0.100 OD 450/620nm érték
Negatív kontroll (NC)	< 0.050 köztes érték OD450/620nm fehér kivonat után
Kalibráló	S/Co >1.1
Pozitív kontroll	>1.000 OD450/620nm érték

Ha a teszteredmény illeszkedik a követelményekhez a fentiek szerint, lépjen tovább a következő lépéshez/fejezethez.

Ha nem, akkor ne végezzen következő lépést, hanem végezze el a következő ellenőrzéseket:

Probléma	Ellenőrzés
Blank > 0.100 OD450nm	1. hogy a Szubsztrát oldat nem kontaminálódott az assay során
Negatív kontroll (NC) > 0.050 OD450nm blaning után	1. hogy a mosási eljárás és a mosó beállítások validáltak az előkvalifikációs tanulmányban; 2. hogy a megfelelő mosóoldatot használták és a mosót prime-olták azzal használat előtt; 3. hogy nem csináltak hibát az assay folyamatában (pozitív kontroll becseppentése negatív kontroll helyett); 4. hogy a negatív kontroll kontaminációja vagy a csövecskéké, ahová a kontroll cseppentve van jelentkezett pozitív minták fröccsenése vagy az enzim konjugátumba jutása miatt, 5. hogy a mikropipetták nem kontaminálódtak pozitív mintákkal vagy enzim konjugátummal 6. hogy a mosó tűi nem dugultak vagy részlegesen elzáródottak.
Kalibráló S/Co < 1.1	1. szabályosan elvégzett eljárások esetén; 2. nem hibáztak az elosztása alatt (pl., negatív kontroll diszpenzáció a kalibráló helyett); 3. a mosási eljárás és a mosóegység beállításai hitelesítve voltak az előminősítési tanulmányok során; 4. a kalibráló külsőleg nem szennyeződött.
Pozitív kontroll <1.000 OD450nm	1. hogy a folyamat megfelelően lett elvégezve; 2. hogy nem csináltak hibát a kontroll folyamatában (negatív kontroll becseppentése pozitív kontroll helyett); Ebben az esetben a negatív kontroll OD450nm > 0.150 3. hogy a mosási eljárás és a mosó beállítások validáltak az előkvalifikációs tanulmányban; 4. hogy a pozitív kontrollnak semmilyen külső kontaminációja nem jelentkezett.

Amennyiben a fenti problémák bármelyike jelentkezik, jelentse a problémát a supervisoroknak további teendők végett.

P.AZ EREDMÉNYEK SZÁMOLÁSA

A teszteredményeket a következő formula által meghatározott cut-off értékek segítségével kell számolni:

$$\text{Cut-off (Co)} = \text{NC közepes} + 0.350$$

A teszthez talált érték használt az eredmények értékeléséhez, mint az a következő fejezetben le van írva.

Q. AZ EREDMÉNYÖSSZEG KIRTÉKELÉSE

A teszt eredmények értelmezése a minta OD450nm és a cut-off érték (vagy S/Co) közötti arány alapján történik a következő táblázatnak szerint:

S/Co	Kiértékelés
< 0.9	Negatív
0.9 - 1.1	Téves
> 1.1	Pozitív

A negatív eredmény jelzi, hogy a beteg nem HCV vírus fertőzött vagy, hogy a véregység transzfúzióra alkalmas. Azonos eredménnyel rendelkező betegek újból tesztelendők 1-2 héttel későbbi minta alapján. A véregység nem alkalmas transzfúzióra. A pozitív eredmény jelzi, hogy a beteg HCV vírus fertőzött, tehát a beteg eszerint kezelendő és a véregység hulladékkezelendő.

Fontos megjegyzések:

- Az eredmények értékelését a laboratóriumi felelős ellenőrzése alatt kell végezni, csökkentendő a megítélési hibákat és félreértelmezéseket.
- Az ismételten pozitív eredményeket Konfirmációs tesztnek kell alávetni, ami képes mérni az IgG és az IgM (konfirmációs teszt) antitesteket mielőtt a vírusos hepatitisz fertőzés diagnózisát kibocsájtják.
- Amint termék teljesítményértékelés során jelezük, az az analízis képes megállapítani a „core” anti-HCV antitestek szérum konverziót egyéb, kereskedelmi készlet használata előtt. Ennél fogva a nem megerősített, pozitív eredmény ezekkel a kereskedelmi készletekkel nem kizárható hamis, pozitív eredményként! Minden esetben a minta konfirmációs tesztet végezzen.
- Lévé, hogy a próba képes meghatározni az IgM osztályzatú antitesteket is, eltérések érzékelhetők egyéb, anti IgM Konjugátumot nem tartalmazó kereskedelmi eszközökkel anti-HCV antitestek tesztelésére. HCV antitest próba valós pozitivitása megerősítendő utóbb az IgM reaktivitás vizsgálatával is, ami fontos a HCV fertőzés diagnózishoz.
- Amikor a teszteredményeket a laboratóriumból az informatikai centrumba juttatják, figyelni kell arra, hogy elkerüljék a hibás adatátvitelt.
- A vírusos hepatitisz infekció diagnózisát minősített orvosnak kell megtennie és kibocsátania a beteg felé.

Kiszámítási példa:

A következő adatok nem használhatók a felhasználó által kapott, valós adatok helyett.

Negatív kontroll: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Köztes érték: 0.020 OD450nm kisebb mint 0.050 – Elfogadott

Pozitív kontroll: 2.189 OD450nm

Magasabb mint 1.000 – Elfogadott

Cut-off = 0.020+0.350 = 0.370

Kalibráló: 0.550 - 0.530 OD450nm

Köztes érték: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S/Co magasabb mint 1.1 – Elfogadott

1. minta: 0.070 OD450nm

2. minta: 1.690 OD450nm

1. minta S/Co < 0.9 = negatív

2. minta S/Co > 1.1 = pozitív

R. SZOLGÁLTATÁS

A teljesítmény értékelés a Közösségi Műszaki Sajátosságok (5. cikk., 3. fejezet, IVD, 98/79/EC irányelv) értelmében mindkét inkubáció esetén (standard és rövid).

1. MÉRÉSI HATÁR

A próba begyűjtés kiszámítása a brit munkaszabványok anti-HCV, NIBSC, 06/188-006 kód. rövid inkubáció eljárás használatával történik. Az alábbi táblázaton az OD450nm átlag értékek láthatók, negatív majd bevizsgált plazmában hígított standard esetén.

Hígítás	Tétel#1	Tétel#2	Tétel#3
Faktor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Negatív plazma	0,25	0,20	0,20

Ugyanakkor a kódolt minta, Accurun 1 - széria 3000 – a Boston Biomedica Inc., USA által elérhető, értékelése "in toto" történt az alábbi eredményekkel:

Accurun 1 széria	Tétel#1	Tétel#2	Tétel#3
Faktor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. DIAGNOSZTIKAI SPECIFIKÁCIÓ ÉS SZENZITIVÁS

A berendezés teljesítményértékelése külsőleg történt több mint 5000 minta alapján.

2.1 Diagnosztikai specifikáció

Negatív jegyzésű próbaként meghatározott specifikus analízis hiányában. Összesen, több mint 5000, alkalmoszerű donátor került vizsgálatra, beleértve az első donátorokat is.

A diagnosztikai sajátosság hitelesített egy, az US FDA engedélyezett kit ellenében.

5043 donátor volt tesztelve 99.5% sajátosság kialakításával.

210 beutalt beteg HCV vírus tesztelve volt; 99.5%-án diagnosztikai specifikációt észleltek. Ugyanakkor, a diagnosztikai specifikáció bizonyított 162 potenciálisan interferáló minta tesztelésével (egyéb fertőző betegségek, E. coli pozitív antitestek, nem vírusos hepatitiszes betegségek, dialízis betegek, várandós nők, hemolizátumos, lipémiás betegek stb.) Elfogadott a 100%-os sajátosság érték.

Nem észleltek hamis reaktivitást a mintaelőkészítési módszer használata miatt. Felhasználásra kerültek úgy a különféle előkészítési standard technikákkal derivált plazmák (citrát, EDTA és heparin), mint a szérumok a specifikus értékek meghatározására. A begyűjtés és tartósítás miatti interferenciák ellenőrzésére befagyasztott minták kerültek felhasználásra. Nem észleltek interferenciát.

2.2 Diagnosztikai szenzitivitás

Fennáll annak a lehetősége, hogy a próba pozitív eredményt hozzon, specifikus analizálandó próbák hiányában. A diagnosztikai szenzitivitás külsőleg bizonyított összesen 348 mintán; 100%-os diagnosztikai

szenzitivitást észleltek. Belsőleg, több mint 50 pozitív minta került tesztelésre szintén 100%-os diagnosztikai szenzitivitás észlelésével.

Sor került a HCV-től genotípustól eltérő genotípusok által okozott fertőzések pozitív próbáinak tesztelésére.

Ugyanakkor, a szerokonverziós munkapultok többségét tanulmányoztuk, amiket a Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) és a Zeptometrix, USA, (HCV) rendelkezésünkre állított.

Ezek közül néhány itt látható.

Panel	Minta sz.	Adaltis ¹	Ortho ^{1, 2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Megjegyzés:

1. Pozitív minták
2. HCV v.3.0

Végül a témék tesztelve volt az EFS Ac HCV, 06.140817 sz. tétel, az Etablissement Francais Du Sang (EFS), Franciaország, rendelkezésre állított felület által, a következő eredményekkel:

EFS Ac HCV panel

Minta	Tétel#1 S/Co	Tétel#2 S/Co	Tétel#3 S/Co	Várható eredmények
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negatív
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitív
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitív
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitív
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitív
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitív

3. PRECÍZIÓ

Öt minta, egy negatív és négy pozitív minta alapján került kiszámításra, 4 ismétlés vizsgálatával, hat külön menetben:

Az eredmények a következők:

Intra lot eredmények: EIAgen Detect HCV AB (v.4) kit: 1st Lot(rövid inkubációs eljárás)

Precízió - %CV				
Minta	S/Co átlag	Tesztben belül	Tesztben kívül	Teljes
Negatív	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitív	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Intra lot eredmények: EIAgen Detect HCV AB (v.4) kit: 1st Lot (hosszú inkubációs eljárás)

Precízió - %CV				
Minta	S/Co átlag	Tesztben belül	Tesztben kívül	Teljes
Negatív	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitív	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Intra lot eredmények: EIAgen HCV Ab (v.4) kit - 1^o, 2^o és 3^o lot (rövid inkubációs eljárás)

Precízió - %CV			
Minta	1. lot	2. lot	3. lot
Negatív	8,65	8,29	6,13
Kalibráló	4,98	4,44	5,38
Pozitív	4,11	3,11	1,37

A táblázatokon látható változékonyság nem a minták téves osztályozásából származik.

S. PROBLÉMAMEGOLDÁSI JAVASLATOK

Kapcsolódván a tesztfolyamathoz és a specifikációkhoz is a reagensek korrekt használata és a megfelelő pipettázás által elkerülhetőek a következő típusú hibák.

HIBA	LEHETSÉGES OKOK / JAVASLATOK
OD nagyon különbözik (± 50%) a leírt QC-tól	- a reagensek nem megfelelő becseppentési térfogata (javaslat: ellenőrizze a becseppentett térfogat és az assay által megkövetelt térfogat egyezőségét: recalibrálja a pipettát) - a nem megfelelő hőmérséklet vagy inkorrekt inkubációs idő (javaslat: több figyelem az inkubátor karbantartása tekintetében, lejegyzendő az inkubáció kezdete) - hiba a mosásban vagy a fotométeres leolvasásban(javaslat: ellenőrizze a készülékek működéseit vagy beállításait) - a Szubsztrát vagy Konjugátum kontaminációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag tartókat használjon)

Alacsony reprodukálhatóságú eredmények	- a minták vagy reagensek nem konstans becseppentési térfogata (javaslat: ellenőrizze a pipetta-pontosságot, ellenőrizze a becseppentett térfogat és az assay által megkövetelt térfogat egyezőségét: recalibrálja a pipettát) - hiba a mosásban vagy a fotométeres leolvasásban(javaslat: ellenőrizze a készülékek működéseit vagy beállításait) - a Szubsztrát kontaminációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag tartókat használjon) - reagensek kontaminációja vagy degradációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag hegyeket és tartókat és desztillált vagy azonos vizet használjon)
nincs kolorimetrikus reakció szubsztrát hozzáadását követően	- néhány reagens nincs bepipettázva - konjugátumok vagy a Szubsztrát erős kontaminációja - hibák az assay kivitelezésében (pl. reagensek véletlenszerű pipettázása rossz sorrendben vagy rossz fiolából stb.)
túl alacsony reakció (túl alacsony OD)	- inkubációs idő túl rövid, - inkubációs hőmérséklet túl alacsony - inkorrekt konjugátum hígítás
Túl magas reakció (túl magas OD)	- inkorrekt konjugátum hígítás - az inkubációs idő túl hosszú, inkubációs hőmérséklet túl magas - vízminőség a mosópufferhez elégtelen (alacsony szintű deionizáció) - elégtelen mosás (a konjugátumok nincsenek megfelelően eltávolítva)
megmagyarázhatatlan eredmények	- a pipetták kontaminációja, hegyek és tartók - inkonstant és elégtelen mosás (konjugátumok nincsenek megfelelően eltávolítva)
Túl magas belső CV%	- reagek és/vagy csíkok nincsenek előmelegítve szobahőmérsékletre használat előtt - a plate mosó nem mos megfelelően (javaslat: tisztítsa meg a mosófejet)
Túl magas külső CV%	- inkubációs kondíciók nem állandóak (idő, hőmérséklet) - a kontrolllok és a minták nem ugyanabban az időben lettek pipettázva (azonos időközökkel) (ellenőrizze a pipettázási sorrendet) - személy-függő különbségek

T. AUTOMATIZÁCIÓ

Ezen használati utasításban azonosított folyamat kézi tesztelésre vonatkozik. Automata készülékek használata esetén, kövesse az utasításokat, amelyek a a készülék gyártójának kézikönyvében vannak benne. A laboratóriumoknak követniük kell az ő validációs folyamataikat, hogy ezen termék kompatibilitását mutassák automatizált rendszereken.

U. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

Egyes, hamis, pozitív eredmények megismétlődési mértéke, amelyeket a konfirmációs RIBA vagy hasonló technikák általi eredmények nem támasztottak alá, bizonyítottan alacsonyabb mint a népesség 0,1%-ában. Fibrin vagy aggregátum részecske tartalmú fagyasztott minták kiolvasztásuk után, hamis pozitív mintákat generáltak.

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhuth MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore—an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretsch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. A cikk megtalálható: <http://www.hepnet.com/nih/gretsch.html>. A Nemzeti Egészségügyi Hivatal által szervezett, C hepatitisz konferenciára készült, amit 1997 március 24-26.-án tartottak Bethesda Maryland-ban
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



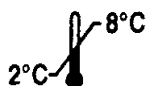
ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067  96

REF 071064  192

REF 071068  480



IVD

CE 0459

Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.

L'affidabilità dei risultati è garantita soltanto se le istruzioni vengono seguite attentamente.



Fabbricante:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

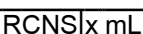
20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

www.adaltis.net

it

SIMBOLI UTILIZZATI NELLE ETICHETTE

Italiano 							
	Dispositivo Medico Diagnostico in Vitro	Numero di Catalogo	Numero di Lotto	Attenzione, leggere le Istruzioni per l'uso	Limiti di Temperatura	Utilizzare Entro	Numero di Test
							
	Fabbricante	Proteggere dalla Luce Solare	Data di Fabbricazione	Micropiastra	Controllo Positivo	Controllo Negativo	Calibratore
							
	Coniugato	Diluente Campioni	Substrato TMB	Soluzione Bloccante (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Tampone di Lavaggio Concentrato 20x	Diluente del Saggio	Ricostituire con x mL
							
	Rischio Biologico	Pericolo	Attenzione				

Attenzione:

Soluzione Bloccante classificata come: Skin Corr. 1A



- Avvertenza:**
Pericolo
- Componenti pericolosi che ne determinano l'etichettatura:**
Acido solforico
- Indicazioni di pericolo:**
H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
- Consigli di prudenza:**
P260 Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P303+P361+P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P405 Conservare sotto chiave.
P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con la regolamentazione locale/regionale/nazionale/ internazionale.

Attenzione:

Controllo Negativo, Controllo Positivo, Calibratore, Coniugato, Diluente Campioni, Diluente del Saggio e Tampone di Lavaggio Concentrato 20X classificati come: Skin Sens. 1



- Avvertenza:**
Attenzione
- Componenti pericolosi che ne determinano l'etichettatura:**
Miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- Indicazioni di pericolo:**
H317 Può provocare una reazione allergica cutanea
- Consigli di prudenza:**
P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P321 Trattamento specifico (vedere su questa etichetta).
P333+P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua.
P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con la regolamentazione locale/regionale/nazionale/ internazionale.

Per le Schede di Sicurezza fare riferimento a www.adaltis.net.

A. FINALITA' D'USO

Dosaggio Immunoenzimatico (ELISA) di quarta generazione per la determinazione degli anticorpi anti Virus dell'Epatite C in plasmi (EDTA, Eparina e Citrato) e sieri umani. Il kit può essere usato per la ricerca degli anticorpi nelle unità di sangue di pazienti affetti da HCV. Solo per uso diagnostico in vitro.

B. INTRODUZIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce l'infezione da Epatite C come segue:

"L'Epatite C è un'infezione virale del fegato che è stata attribuita a epatiti "non A, non B" parenteralmente trasmesse fino all'identificazione dell'agente causante nel 1989. La scoperta e la caratterizzazione del virus dell'epatite C (HCV) porta alla comprensione del suo primario ruolo nelle epatiti post-trasfusione e la sua tendenza ad indurre infezioni persistenti".

L'HCV è trasmesso principalmente per contatto diretto con sangue umano. Le maggiori cause di HCV nel mondo sono l'uso di unità di sangue non controllato per le trasfusioni e il riutilizzo di aghi e siringhe non adeguatamente sterilizzati.

Nessuno vaccino è al momento disponibile per prevenire l'epatite C e il trattamento delle epatiti C croniche troppo costoso perché i popoli dei paesi in via di sviluppo possano permetterselo. Allora, da una prospettiva globale, il più grande impatto sui malati di epatite C sarà ottenuto focalizzando gli sforzi sulla riduzione dei rischi della trasmissione di HCV da esposizioni nosocomiali (trasfusioni di sangue, iniezioni non sicure) e comportamenti ad alto rischio (iniezione di droghe).

Il virus dell'epatite C (HCV) è uno dei virus (A, B, C, D, e E), che sono responsabili della maggioranza dei casi di epatite virale. E' un virus RNA avvolto della famiglia Flaviviridae che mostra di avere uno stretto spettro d'ospite. Gli umani e gli scimpazee sono le sole specie suscettibili all'infezione ed entrambi sviluppano le stesse malattie. Una caratteristica importante del virus è la relativa mutabilità del genoma, che è probabilmente legata all'alta tendenza (80%) nell'indurre infezioni croniche. L'HCV è riunito in diversi genotipi distinti che possono essere importanti nella determinazione della gravità della malattia e la risposta al trattamento.

Il periodo di incubazione dell'infezione da HCV primadell'inizio dei sintomi clinici va da 15 a 150 giorni. Nelle infezioni acute i sintomi più comuni sono affaticamento e itterizia; comunque la maggior parte dei casi (tra il 60% e il 70%), anche quelli che sviluppano l'infezione cronica, sono asintomatici. Circa l'80% dei nuovi pazienti infettati sviluppa un'infezione cronica. Cirrosi si sviluppano all'incirca dal 10 % al 20% che hanno un'infezione cronica, mentre cancro al fegato si manifesta tra l'1% e il 5% delle persone che hanno un'infezione cronica per un periodo da 20 a 30 anni. La maggior parte di pazienti che soffrono di cancro al fegato che non presentano infezione da epatite B mostrano infezione da HCV. Il meccanismo per cui l'infezione da HCV porta al cancro al fegato non è ancora ben chiaro.

L'epatite C accresce la gravità delle malattie del fegato quando coesiste con altre condizioni epatiche. In particolare, le malattie del fegato progrediscono più rapidamente in persone con malattie epatiche provocate da abuso di alcol e con infezione da HCV. L' HCV è trasmessa principalmente per contatto diretto con sangue infetto. La trasmissione attraverso trasfusioni di sangue non esaminato per l'HCV, il riutilizzo di aghi, siringhe e altre attrezzature mediche non adeguatamente sterilizzate, o attraverso lo scambio di aghi tra drogati, è molto ben documentata. La trasmissione per via sessuale o perinatale può anche avvenire ma meno frequentemente. Altri modi di trasmissione legati a pratiche comportamentali, sociali, culturali (body piercing, circoncisioni e tatuaggi) possono avvenire se vengono utilizzati strumenti non adeguatamente sterilizzati. L' HCV non è trasmesso attraverso starnuti, abbracci, tosse, cibo o acqua, condividendo posate o bicchieri o per contatto casuale. Sia nei paesi sviluppati che quelli in via di sviluppo, gruppi ad alto rischio includono gli utilizzatori di droghe iniettabili, i riceventi di sangue non esaminato, emofilici, dializzati e persone con numerosi partners sessuali che praticano rapporti non protetti. Nei paesi sviluppati, si stima che il 90% delle persone con infezione da HCV cronica siano principalmente utilizzatori di droghe iniettabili e quelli con una storia di trasfusioni di sangue non esaminato o emoderivati. Nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, dove sangue e emoderivati non esaminati sono ancora usati, il principale mezzo di trasmissione dell'infezione sono strumenti per le iniezioni non sterilizzati e trasfusioni di sangue non controllato. Inoltre le persone che praticano riti sacrificali e circoncisioni sono a rischio se usano o riusano ferri non sterilizzati.

L'OMS stima che circa 170 milioni di persone, il 3% della popolazione mondiale sono infettate da HCV e sono a rischio di sviluppare cirrosi e/o cancro al fegato. La prevalenza dell'infezione HCV in Africa, Medio Oriente, Sud Est asiatico e Pacifico occidentale è alta se comparata con Nord America ed Europa.

I test diagnostici per HCV sono usati per prevenire l'infezione attraverso lo screening dei donatori di sangue e plasma, per stabilire la diagnosi clinica e prendere meglio decisioni riguardo la cura di un paziente. I tests diagnostici oggi disponibili sono basati su dosaggi immunoenzimatici (EIA) per la rilevazione di specifici anticorpi HCV. Il sistema EIA può rilevare più del 95% di pazienti cronicamente infetti ma solo dal 50% al 70% delle infezioni acute. Un saggio immunoblot ricombinante (RIBA) che identifica gli anticorpi che reagiscono con antigeni individuali HCV è spesso usato come un test supplementare per la conferma di un risultato EIA positivo. Test per HCV basati sull'amplificazione dell' RNA (es. PCR, saggio a DNA legato) è anche stato usato per la conferma del risultato serologico sia per l'assegnazione di un'efficace terapia antivirale. Un risultato positivo indica la presenza di infezione attiva e la possibilità di diffusione dell'infezione e/o lo sviluppo di malattie croniche del fegato.

Farmaci antivirali come l'interferone assunto da solo o in combinazione con ribavirina, può essere usata per il trattamento di persone con epatite C cronica, ma il costo

del trattamento è molto alto. Il trattamento con interferone da solo è efficace in circa il 10%-20% dei pazienti. L'interferone combinato con ribavirina è efficace nel 30%-50% dei pazienti. La ribavirina non sembra essere efficace quando usata da sola.

Non c'è nessun vaccino efficace contro l'HCV. La ricerca procede ma l'alta mutabilità del genoma dell'HCV complica lo sviluppo di un vaccino. La mancanza di conoscenze di qualche risposta immuno-protettiva seguente l'infezione da HCV impedisce anche la ricerca del vaccino. Nemmeno si sa se il sistema immunitario è in grado di eliminare il virus.

Qualche studio comunque ha mostrato la presenza di anticorpi neutralizzanti il virus nei pazienti affetti da HCV. In assenza di un vaccino, devono essere prese tutte le precauzioni per prevenire l'infezione incluse (a) screening e test di sangue e organi; (b) disattivazione del virus in plasmi e prodotti derivati; (c) accrescimento e mantenimento delle pratiche di controllo dell'infezione nei protocolli d'attenzione sanitaria, come l'appropriata sterilizzazione di strumenti medici e dentali; (d) la promozione di cambiamenti nei comportamenti tra la gente comune e gli operatori sanitari per ridurre l'uso eccessivo di iniezioni e la pratica di iniezioni sicure; (e) la riduzione del rischio per persone che fanno uso di droga e pratiche sessuali ad alto rischio".

Il genoma codifica per i componenti strutturali, una proteina nucleocapsidica e glicoproteine dell'envelope, e i costituenti funzionali coinvolti nella replicazione del virus e nel processamento delle sue proteine. La regione codificante nucleocapsidica sembra essere la più conservativa tra gli isolati ottenuti nel mondo.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Le micropiastre sono coattate con antigeni HCV-specifici derivanti dalle regioni "core" e "ns" codificanti per i conservativi e i determinanti antigenici immunodominanti (Core peptide, ricombinante NS3, NS4 e NS5 peptidi).

La fase solida è prima trattata con il campione diluito e gli anticorpi HCV sono catturati, se presenti, dagli antigeni. Dopo aver lavato via tutti gli altri componenti del campione, nella seconda incubazione legati gli anticorpi HCV, le IgG e le IgM sono rilevate dall'aggiunta di specifici anticorpi policlonali anti IgG&M, etichettati con perossidasi (HRP).

L'enzima catturato sulla fase solida, reagendo con la miscela substrato TMB, genera un segnale ottico che è proporzionale alla quantità di anticorpi anti HCV presenti nel campione. Un valore di cut-off permette di interpretare le densità ottiche in risultati positivi e negativi in anticorpi HCV.

D. COMPONENTI

Il kit contiene reagenti per 96 tests (codice 071067), 192 tests (codice 071064), o 480 tests (codice 071068).

Micropiastra	1
Controllo Negativo	1x4 mL/flacone
Controllo Positivo	1x2 mL/flacone
Calibratore	2 flaconi
Soluzione di Lavaggio conc. 20x	1x50 mL/flacone
Coniugato	1x16 mL/flacone
Diluyente dei Campioni	1x50 mL/flacone
Substrato TMB	1x16 mL/flacone
Soluzione Bloccante	1x15 mL/flacone
Diluyente del Saggio	1x8 mL/flacone
Foglio copripiastro	2
Numero dei tests	96
Codice	071067

Micropiastra	2
Controllo Negativo	2x4 mL/flaconi
Controllo Positivo	1x4 mL/flacone
Calibratore	3 flaconi
Soluzione di Lavaggio conc. 20x	2x50 mL/flaconi
Coniugato	2x16 mL/flaconi
Diluyente dei Campioni	2x50 mL/flaconi
Substrato TMB	2x16 mL/flaconi
Soluzione Bloccante	2x15 mL/flaconi
Diluyente del Saggio	2x8 mL/flaconi
Foglio copripiastro	4
Numero dei tests	192
Codice	071064

Micropiastra	5
Controllo Negativo	1x20 mL/flacone
Controllo Positivo	1x10 mL/flacone
Calibratore	7 flaconi
Soluzione di Lavaggio conc. 20x	5x50 mL/flaconi
Coniugato	2x40 mL/flaconi
Diluyente dei Campioni	5x50 mL/flaconi
Substrato TMB	2x40 mL/flaconi
Soluzione Bloccante	2x40 mL/flaconi
Diluyente del Saggio	1x40 mL/flacone
Foglio copripiastro	10
Numero dei tests	480
Codice	071068

1. Micropiastra

12 strips di 8 microcelle coattate con Core peptide, ricombinante NS3, NS4 e NS5 peptidi. Le piastre sono sigillate in una busta di alluminio con essicante.

Portare la micropiastra a temperatura ambiente (18...24°C) prima di aprire la busta. Risigillare le strips non utilizzate nella busta con l'essicante e conservare a 2...8°C.

2. Controllo Negativo

Controllo pronto all'uso. Contiene tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1, 2% di caseina e 0.1% Proclin 150 come conservante. Il controllo negativo è codificato di colore verde oliva.

3. Controllo Positivo

Controllo pronto all'uso. Contiene l'1% di proteine da siero di capra, anticorpi umani positivi all'HCV, tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide e 0.1% Proclin 150 come conservanti. Il controllo positivo è codificato di colore verde scuro.

Nota Importante: L'assenza di agenti patogeni vitali nel Controllo Positivo non può essere pienamente garantita,

e quindi, il reagente deve essere trattato come potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio.

4. Calibratore

Calibratore liofilo. Deve essere disciolto con il volume di acqua grado EIA riportato sull'etichetta. Contiene proteine da siero bovino fetale, anticorpi all'HCV umani il cui contenuto è calibrato su NIBSC Working Standard codice 06/188-006, 10mM di tampone Na-citrato a pH 6.0 ± 0.1 , 0.3 mg/mL di gentamicina solfato e 0.1% di Proclin 150 come conservanti.

Nota Importante: L'assenza di agenti patogeni vitali nel Calibratore non può essere pienamente garantita, e quindi, il reagente deve essere trattato come potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio.

Note: il volume necessario per sciogliere il contenuto della fiala può variare da lotto a lotto. Si prega di usare il corretto volume riportato sull'etichetta.

5. Soluzione di Lavaggio Concentrata 20x

Soluzione concentrata 20X. Una volta diluita, la soluzione di lavaggio (tampone di lavaggio diluito) contiene tampone fosfato 10 mM a pH 7.0 ± 0.2 , 0.05% Tween 20 e 0.05% Proclin 150.

Una volta diluita la soluzione di lavaggio rimane stabile per 1 settimana a 2...8°C.

6. Coniugato

Reagente pronto all'uso e codificato di colore rosso. Contiene perossidasi di rafano coniugata a anticorpi policlonali di capra ad IgG e IgM umane, 5% BSA, tampone Citrato 10 mM a pH 6.4 ± 0.1 , 0.1% Proclin e 0.05% Tween 20 come conservanti.

7. Substrato TMB

Componente pronto all'uso. Contiene tampone citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetil-solfossido al 4%, 0.03% di tetrametilbenzidina (TMB) e 0.02% di perossido d'idrogeno (H_2O_2). Miscelare gentilmente prima dell'uso.

Nota: Deve essere conservato protetto dalla luce in quanto sensibile alla forte illuminazione.

8. Diluente del Saggio

Componente pronto all'uso. Contiene siero di capra, soluzione tamponata di Tris 10mM a pH 8.0 ± 0.1 contenente 0.1% di Proclin 150 e 0.09% Na-azide per il pretrattamento dei campioni e dei controlli in piastra, bloccando le interferenze.

9. Soluzione Bloccante

Componente pronto all'uso.

Contiene una soluzione 0.3 M di H_2SO_4 . Miscelare gentilmente prima dell'uso.

10. Diluente Campione

Componente pronto all'uso e codificato di colore verde scuro. Contiene 1% di caseina, tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1 e 0.1% Proclin 150 come conservante.

Usare per diluire il campione.

Nota: Il diluente cambia colore da verde oliva a verde scuro-blu in presenza del campione.

E. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (200 μ L e 10 μ L) e puntali usa e getta.
2. Acqua di grado EIA (bidistillata o deionizzata, trattata con carbone attivo per rimuovere gli ossidanti chimici usati come disinfettanti).
3. Timer con intervallo di tempo di 60 min o più.
4. fogli di carta assorbente.
5. Incubatore termostatico calibrato per micropiastre ELISA in grado di fornire una temperatura di +37°C.
6. Lettore calibrato di microcelle ELISA con lettura a 450nm possibilmente con filtri a 620-630nm per la determinazione del bianco.
7. Lavatore calibrato di micropiastre ELISA.
8. Vortex o similari strumenti per miscelare.

F. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico specializzato e correttamente addestrato, sotto la supervisione del medico responsabile del laboratorio. Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.
2. Leggere attentamente la Scheda di Sicurezza (SDS) prima di effettuare il dosaggio.
3. Quando il kit è usato per lo screening di unità di sangue e componenti del sangue, deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale in quel campo (Ministero della Sanità o simili) per eseguire questo tipo di analisi.
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del saggio deve indossare abiti protettivi da laboratorio, guanti in lattice senza talco e occhiali. L'uso di ogni dispositivi appuntito (aghi) o tagliente (lame) dovrebbe essere evitato. Tutto il personale coinvolto dovrebbe essere addestrato sulle procedure di sicurezza personale, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie di Atlanta, US. e riportato nella pubblicazione dell'Istituto Nazionale di Sanità: "Sicurezza personale nei Laboratori Microbiologici e Biomedici", ed. 1984.
5. Tutto il personale coinvolto nel maneggiare i campioni dovrebbe essere vaccinato per HBV e HAV, per cui i vaccini sono disponibili sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente di laboratorio dovrebbe essere controllato così da evitare contaminazioni da polvere e agenti microbiologici nell'aria, quando si aprono le fiale e la micropiastra del kit e quando viene eseguito il test. Proteggere il cromogeno/substrato TMB dalla luce forte ed evitare vibrazioni del banco di lavoro una volta iniziato il test.
7. Dal ricevimento, conservare il kit a 2...8°C in un frigorifero o camera fredda a temperatura controllata.
8. Non scambiare i componenti tra differenti lotti del kit. E' raccomandato non scambiare i componenti di due kit dello stesso lotto.
9. Controllare che i reagenti siano limpidi e non contengano grosse particelle o aggregati. Se ciò accade allertare il supervisore del laboratorio per iniziare le necessarie procedure per la sostituzione del kit.
10. Evitare contaminazioni incrociate tra campioni di sieri/plasmi usando puntali monouso e cambiandoli dopo ogni campione.

11. Evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti del kit usando puntali monouso e cambiandoli per l'uso di ogni componente.
12. Non usare il kit dopo la data di scadenza impressa sulla confezione esterna e sull'etichetta di ogni singola fiala all'interno.
13. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infetti. Tutti i sieri umani dovrebbero essere maneggiati secondo il Livello 2 di BioSicurezza, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie, Atlanta, US. insieme con quanto riportato nella pubblicazione dell'Istituto di Sanità: "BioSicurezza nei laboratori Microbiologici e Biomedicali", ed. 1984.
14. L'uso di contenitori di plastica monouso è raccomandato per la preparazione dei componenti liquidi o per i componenti trasferiti nelle postazioni automatizzate, questo per evitare contaminazioni incrociate.
15. I prodotti di scarto durante l'uso del kit devono essere scaricati secondo le direttive nazionali e le leggi riguardanti i rifiuti di sostanze chimiche e biologiche di laboratorio. In particolare, gli scarichi liquidi generati dalla procedura di lavaggio, da avanzi dei controlli e dai campioni devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti e inattivati prima di essere eliminati. Si suggerisce di inattivare per trattamento con una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per 16-18 ore o disattivazione a caldo in autoclave a 121°C per 20 minuti.
16. Rovesciamenti accidentali dei campioni durante le operazioni devono essere assorbiti con fogli di carta imbevuti di ipoclorito di sodio e poi sciacquati con acqua. I fogli di carta vanno poi gettati nell'apposito contenitore dei rifiuti per materiali biologici.
17. La Soluzione bloccante contiene acido solforico allo 0.3 M. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto sciacquare subito e abbondantemente con acqua.
18. Le soluzioni reagenti che contengono sodio azide o thimerosal quali conservanti, devono essere trattate seguendo le disposizioni e le leggi al riguardo che vigenti nello Stato in cui si opera. L'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide prevede l'uso di acqua corrente in grande quantità. Porre attenzione al fatto che la sodio azide può formare composti esplosivi a contatto prolungato con piombo e rame.
19. Non fumare, non mangiare o applicare cosmetici nelle aree dove campioni e reagenti vengono maneggiati.
20. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (ad esempio: i puntali usati per controlli e campioni, micropiastre usate) dovrebbero essere maneggiate come potenzialmente infetti e riposti in accordo alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.
21. Non pipettare con la bocca.

G. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue è estratto asepticamente per prelievo in vena e i plasmi o sieri sono preparati usando le tecniche standard di preparazione dei campioni per analisi cliniche di laboratorio. Nessuna influenza è

stata osservata nella preparazione del campione con citrato, EDTA o eparina.

2. Evitare ogni aggiunta di conservanti ai campioni; specialmente sodio azide che può influenzare l'attività enzimatica del coniugato, generando risultati di falsi negativi.
3. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare confusione nell'interpretazione dei risultati. Quando il kit è usato per lo screening di unità di sangue è fortemente raccomandato di etichettare con codici a barre e leggere elettronicamente.
4. Campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattiginosi) devono essere scartati perché potrebbero generare risultati falsi. I campioni contenenti residui di fibrina o grosse particelle o filamenti e corpi microbiologici dovrebbero essere scartati perché potrebbero dare origine a risultati falsi.
5. Sieri e plasmi possono essere conservati a +2...8°C fino a cinque giorni dopo il prelievo. Per conservazioni più lunghe, i campioni possono essere congelati a -20°C per diversi mesi. Qualsiasi campione congelato non può essere congelato e scongelato più di una volta perché questo genera particelle che possono influenzare il risultato del test.
6. Se sono presenti delle particelle centrifugare a 2.000 rpm per 20 minuti o filtrare con filtri a 0.2-0.8µm per pulire il campione da testare.

H. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

Studi condotti su un kit aperto non hanno mostrato alcuna rilevante perdita di attività fino a 1 riutilizzo dello stesso materiale in 6 mesi.

1. Micropiastre:

Permettere che la micropiastre raggiunga la temperatura ambiente (almeno 1h) prima di aprire la busta. Controllare che l'essiccante non sia diventato verde scuro, indicando un difetto di conservazione. In questo caso chiamare il servizio clienti Adaltis.

Le strips non utilizzate devono essere riposte nell'apposita busta, in presenza del l'essiccante fornito, sigillate fermamente e conservate a 2...8°C. Dopo la prima apertura le strips residue sono stabili fino a quando l'indicatore di umidità presente all'interno della busta dell'essiccante vira da giallo a verde.

2. Controllo Negativo:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

3. Controllo Positivo:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Trattare questo componente come potenzialmente infetto.

4. Calibratore:

Sciogliere attentamente il contenuto liofilo della fiala con il volume di acqua di grado EIA riportato sulla sua etichetta. Miscelare su vortex prima dell'uso.

Trattare questo componente come potenzialmente infetto.

Nota: Una volta sciolto il calibratore non è stabile. Conservare in aliquote a -20°C.

5. Soluzione di Lavaggio concentrata 20x: (flacone da 50 mL):

L'intero contenuto della soluzione concentrata 20x deve essere diluita con acqua bidistillata fino a 1000 mL (il volume è riportato sull'etichetta) e miscelata gentilmente prima dell'uso. Dal momento che la soluzione può presentare formazioni cristalline, porre attenzione a dissolvere tutto il contenuto. Nella preparazione evitare di generare schiuma perché la presenza di bolle può diminuire l'efficacia del lavaggio.

Nota: Una volta diluita, la soluzione di lavaggio è stabile per 1 settimana a +2..8°C.

6. Coniugato:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione per non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

7. Substrato TMB:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione per non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Non esporre a forte illuminazione, agenti ossidanti e superfici metalliche. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

8. Diluente del Saggio:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

9. Soluzione Bloccante:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

10. Diluente del Campione:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

I. STRUMENTAZIONE USATA IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le micropipette devono essere calibrate per rilasciare il corretto volume richiesto dal saggio e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcool denaturato, candeggina al 10%, soluzione disinfettante ospedaliera) di quelle parti che potrebbero accidentalmente entrare in contatto con il campione. Esse dovrebbero essere tenute controllate per mostrare una precisione dell'1% e una correttezza di $\pm 2\%$. La decontaminazione di schizzi o residui di componenti del kit dovrebbe essere eseguita regolarmente.
2. L'incubatore ELISA dovrebbe essere tarato a 37°C (tolleranza di $\pm 0.5^\circ\text{C}$) e regolarmente controllato per assicurare il mantenimento della temperatura corretta. Entrambi incubatori a secco e bagni ad acqua sono utilizzabili per le incubazioni se gli strumenti sono convalidati per l'incubazione di tests ELISA.
3. Il lavatore ELISA è estremamente importante per la totale riuscita del saggio. Il lavatore deve essere convalidato con attenzione e correttamente ottimizzato. Di solito sono sufficienti 4-5 cicli di lavaggio (aspirazione + dispensazione di 350 μl di soluzione di lavaggio = 1 ciclo) per assicurare che il saggio dia il risultato atteso. E' suggerito un intervallo di soaking di 20-30 secondi tra i cicli.

Per stabilire correttamente il loro numero, si raccomanda di eseguire un test di prova con i controlli del kit e campioni di riferimento ben caratterizzati come positivi o negativi, e controllare la corrispondenza ai valori riportati sotto nella sezione O "Controllo di qualità interno". La regolare calibrazione del volume erogato e la manutenzione del lavatore (decontaminazione e pulizia degli aghi) deve essere compiuta secondo le indicazioni del produttore.

4. I tempi di incubazione hanno una tolleranza di $\pm 5\%$.
 - ✓ Metodo di Incubazione Breve (per la 1^a/2^a incubazione la tolleranza è compresa tra 43 min. e 47 min.; per la 3^a incubazione la tolleranza è compresa tra 14 e 16 min.).
 - ✓ Metodo di Incubazione Standard (per la 1^a incubazione la tolleranza è compresa tra 57 min. e 63 min.; per la 2^a e 3^a incubazione la tolleranza è compresa tra 29 e 31 min.).
5. Il lettore di micropiastre ELISA deve essere dotato di un filtro di lettura di 450nm e idealmente di un secondo filtro (620-630nm) per le operazioni del bianco. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) ampiezza di banda $\leq 10\text{nm}$; (b) intervallo di assorbimento da 0 a ≥ 2.0 ; (c) linearità ≥ 2.0 ; (d) ripetibilità $\geq 1\%$. Il bianco è determinato secondo le istruzioni contenute nella sezione "Procedura del Saggio". Il sistema ottico del lettore deve essere calibrato regolarmente per assicurare la corretta misurazione della densità ottica. La manutenzione dovrebbe essere fatta regolarmente secondo le istruzioni del produttore.
6. Quando si usa una stazione di lavoro automatizzata per kit ELISA, tutti i passi critici (dispensazione, incubazione, lavaggio, lettura, manipolazione dei dati) devono essere attentamente controllati, calibrati, e regolarmente sistemati per conservare la corrispondenza con i valori riportati nelle sezioni O "Controllo di qualità interno". Il protocollo del saggio deve essere installato nel sistema operativo dell'unità e convalidato come per il lavatore e il lettore. In più, la parte della stazione che manipola i componenti liquidi (dispensazione e lavaggio) deve essere convalidata e correttamente impostata. Particolare attenzione va mostrata nell'evitare il trascinarsi da parte degli aghi usati per la dispensazione e il lavaggio. Questo deve essere studiato e controllato per minimizzare la possibilità di contaminazione dalle celle adiacenti. L'uso di stazioni di lavoro automatizzate ELISA è raccomandata per lo screening di sangue quando il numero dei campioni da testare è maggiore di 20-30 per corsa della macchina.

L. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE SAGGIO

1. Controllare la data di scadenza del kit, stampata sull'etichetta esterna della scatola. Non usare il kit se è scaduto.
2. Controllare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili a occhio nudo. Controllare che il Substrato TMB sia incolore o blu pallido aspirando un piccolo volume dello stesso con una pipetta di plastica sterile trasparente. Controllare che nessuna rottura della confezione sia avvenuta nel trasporto e nessuna fuoriuscita di liquido sia presente all'interno della scatola. Controllare che

la busta di alluminio, contenente la micropiastra, non sia bucata o danneggiata.

3. Diluire tutto il contenuto della Soluzione di Lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
4. Sciogliere il calibratore come descritto sopra.
5. Permettere a tutti i componenti del kit di raggiungere la temperatura ambiente (circa 1h) e poi miscelare come descritto.
6. Impostare l'incubatore ELISA a +37°C e preparare il lavatore ELISA avvinandolo con la soluzione di lavaggio diluita, secondo le istruzioni del produttore. Impostare il corretto numero di cicli di lavaggio come riportato nella sezione I.3.
7. Controllare che il lettore ELISA sia acceso da almeno 20 minuti prima della lettura.
8. Se si utilizza una stazione di lavoro automatizzata, accenderla, controllare le impostazioni e assicurarsi di usare il protocollo corretto.
9. Controllare che le micropipette siano impostate al volume richiesto.
10. Controllare che tutti gli strumenti siano disponibili e pronti all'uso.
11. In caso di problemi non procedere oltre con il test e informare il supervisore.

M. PROCEDURA DEL SAGGIO

Il saggio deve essere eseguito in accordo a quanto riportato di seguito, prestando attenzione a mantenere la stessa incubazione per tutti i campioni da testare.

Il saggio può essere eseguito tramite due procedure di incubazione. Scegliere quella più idonea alla vostra regolamentazione:

1. Incubazione Standard (1^a incubazione 60 minuti, 2^a e 3^a incubazione 30 minuti)
2. Incubazione Breve (1^a e 2^a incubazione 45 minuti, 3^a incubazione 15 minuti)

1. Incubazione Standard - Saggio Manuale:

1. Inserire il corretto numero di micropozzetti nell'apposito sostegno. Lasciare la prima cella vuota per le operazioni del bianco.
2. Dispensare 200 µL di Controllo Negativo in triplo, 200 µL di Calibratore in doppio e 200 µL di Controllo Positivo in singolo nelle celle appropriate. Non diluire Controlli e Calibratore in quanto già prediluiti e pronti all'uso!
3. Aggiungere 200 µL di Diluente Campioni a tutte le celle dei campioni; poi dispensare 10 µL di campione in ogni cella propriamente identificata. Agitare gentilmente la piastra, evitando straripamenti e contaminazioni delle celle adiacenti, per disciogliere completamente il campione nel suo diluente.

Nota importante: Controlla che il colore del Diluente del Campione, dopo l'aggiunta del campione, viri da verde chiaro a verde-blu scuro, indicando che il campione è stato aggiunto.

4. Dispensare 50 µL di Diluente del Saggio in tutte le celle dei controlli/calibratore e dei campioni. Controllare che il colore dei campioni viri a blu scuro.
5. Incubare la micropiastra per **60 min a +37°C**.
Nota Importante: Le strips devono essere coperte con l'apposito foglio adesivo fornito, solo quando il

test è eseguito manualmente. Non coprire la strips quando si usa uno strumento ELISA automatizzato.

6. Lavare la micropiastra con un lavatore automatico rilasciando e aspirando 350 µL/cella di soluzione di lavaggio diluita come riportato nella sezione I.3.
7. Pipettare 100 µL di Coniugato Enzimatico in tutte le celle tranne quella del bianco, e coprire con il foglio adesivo. Controllare che questo componente di colore rosso sia stato dispensato in tutte le celle, eccetto A1.

Nota Importante: Attenzione a non urtare la superficie della plastica interna della cella con il puntale pieno di Coniugato. Possono avvenire contaminazioni.

8. Incubare la micropiastra per **30 min a +37°C**.
9. Lavare le celle come riportato nella sezione I.3.
10. Pipettare 100 µL di miscela Substrato TMB in ogni cella e anche in quella del bianco. Incubare la micropiastra a **temperatura ambiente (18-24°C) per 30 minuti**.

Nota Importante: Non esporre a forte illuminazione diretta. Può determinare fondi alti.

11. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto usando la stessa sequenza di pipettamento descritta nel punto 10 per fermare la reazione enzimatica. L'aggiunta di Soluzione Bloccante farà virare il controllo positivo e i campioni positivi da blu a giallo.
12. Misurare l'intensità di colore della soluzione in ogni cella, come descritto nella sezione 1.5, con un filtro di lettura a 450 nm e possibilmente con un filtro a 620-630nm per le operazioni del bianco in posizione A1 della micropiastra.

Note importanti:

1. Se il secondo filtro non è disponibile assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo della micropiastra prima della lettura a 450nm. Tali impronte potrebbero generare falsi positivi.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 20 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire una leggera auto-ossidazione del substrato e portare ad un risultato di fondo alto.
3. L'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione ha dimostrato che la sensibilità del dosaggio aumenta circa del 20%.

2. Incubazione Breve - Saggio Manuale:

1. Inserire il corretto numero di micropozzetti nell'apposito sostegno. Lasciare la prima cella vuota per le operazioni del bianco.
2. Dispensare 200 µL di Controllo Negativo in triplo, 200 µL di Calibratore in doppio e 200 µL di Controllo Positivo in singolo nelle celle appropriate. Non diluire Controlli e Calibratore in quanto già prediluiti e pronti all'uso!
3. Aggiungere 200 µL di Diluente Campioni a tutte le celle dei campioni; poi dispensare 10 µL di campione in ogni cella propriamente identificata. Agitare gentilmente la piastra, evitando straripamenti e

contaminazioni delle celle adiacenti, per disciogliere completamente il campione nel suo diluente.

Nota importante: Controlla che il colore del Diluente del Campione, dopo l'aggiunta del campione, viri da verde chiaro a verde-blu scuro, indicando che il campione è stato aggiunto.

4. Dispensare 50 µL di Diluente del Saggio in tutte le celle dei controlli/calibratore e dei campioni. Controlla che il colore dei campioni viri a blu scuro.
5. Incubare la micropiastra per **45 min a +37°C**.
Nota Importante: Le strips devono essere coperte con l'apposito foglio adesivo fornito, solo quando il test è eseguito manualmente. Non coprire la strips quando si usa uno strumento ELISA automatizzato.
6. Lavare la micropiastra con un lavatore automatico rilasciando e aspirando 350 µL/cella di soluzione di lavaggio diluita come riportato nella sezione I.3.
7. Pipettare 100 µL di Coniugato Enzimatico in tutte le celle tranne quella del bianco, e coprire con il foglio adesivo. Controllare che questo componente di colore rosso sia stato dispensato in tutta le celle, eccetto A1.

Nota importante: Attenzione a non urtare la superficie della plastica interna della cella con il puntale pieno di coniugato. Possono avvenire contaminazioni.

8. Incubare la micropiastra per **45 min a +37°C**.
9. Lavare le celle come riportato nella sezione I.3.
10. Pipettare 100 µL di miscela Substrato TMB in ogni cella e anche in quella del bianco. Incubare la micropiastra a temperatura ambiente (18-24°C) per **15 minuti**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto usando la stessa sequenza di pipettamento descritta nel punto 10 per fermare la reazione enzimatica. L'aggiunta di Soluzione Bloccante farà virare il controllo positivi e i campioni positivi da blu a giallo.
12. Misurare l'intensità di colore della soluzione in ogni cella, come descritto nella sezione 1.5, con un filtro di lettura a 450 nm e possibilmente con un filtro a 620-630nm per le operazioni del bianco in posizione A1 della micropiastra.

Note importanti:

1. Se il secondo filtro non è disponibile assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo della micropiastra prima della lettura a 450nm. Tali impronte potrebbero generare falsi positivi.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 20 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire leggera auto-ossidazione del substrato e portare ad un risultato di fondo alto.
3. L'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione ha dimostrato che la sensibilità del dosaggio aumenta circa del 20%.

N. SCHEMA DEL SAGGIO

Metodo	Operazioni (Incubazione Standard)	Operazioni (Incubazione Breve)
Controlli & Calibratore	200 µL	200 µL
Diluente Campioni e Campione	200 µL diluente+ 10 µL campione	200 µL diluente+ 10 µL campione
Diluente del Saggio	50 µL	50 µL
1a incubazione	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavaggio	4-5 cicli	4-5 cicli
Coniugato Enzimatico	100 µL	100 µL
2a incubazione	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavaggio	4-5 cicli	4-5 cicli
Substrato TMB	100 µL	100 µL
3a incubazione	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatura	Temperatura ambiente (18...24°C)	Temperatura ambiente (18...24°C)
Soluzione Bloccante	100 µL	100 µL
Lettura OD	450/620nm	450/620nm

Un esempio di schema di dispensazione è riportato sotto (valido per entrambe le procedure di incubazione):

Micropiastra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Bianco NC = Controllo Negativo
CAL = Calibratore PC = Controllo Positivo S = Campione

O. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

Un controllo di validazione è eseguito sui controlli e il calibratore ogni volta che il kit viene usato per verificare che le prestazioni del saggio siano conformi sia ai valori di OD450/620nm sia ai valori attesi e riportati nella seguente tabella:

Controllo	Requisiti
Bianco	< 0.100 OD 450/620nm valore
Controllo Negativo (NC)	< 0.050 valore medio OD450/620nm dopo sottrazione del bianco
Calibratore	S/Co >1.1
Controllo Positivo	>1.000 OD450/620nm valore

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti stabiliti sopra, procedere alla prossima sezione.

Se non corrispondono, non procedere ulteriormente e eseguire i seguenti controlli:

Problemi	Controllo
Bianco > 0.100 OD450nm	1. che la soluzione Substrato non si sia contaminata durante il saggio
Controllo Negativo (NC) > 0.050 OD450nm dopo sottrazione del bianco	1. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 2. che sia stata usata la corretta soluzione di lavaggio e che il lavatore sia stato avvinato prima dell'uso; 3. che nessun errore sia stato commesso nella procedura del saggio (dispensazione del controllo positivo invece del negativo); 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione del controllo negativo o delle sue celle a causa di schizzi dei campioni positivi o del coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non siano contaminate con campioni positivi o coniugato enzimatico; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
Calibratore S/Co < 1.1	1. che le procedure siano state correttamente eseguite; 2. che nessun errore sia avvenuto durante la sua distribuzione (es. dispensazione del controllo negativo al posto del calibratore); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione esterna del calibratore.
Controllo Positivo <1.000 OD450nm	1. che le procedure siano state eseguite correttamente; 2. che nessun errore sia stato commesso nella distribuzione del controllo (dispensazione del controllo negativo al posto del positivo). In questo caso il controllo negativo mostrerà un OD450nm > 0.150 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione esterna del controllo positivo

Se si è verificato qualcuno dei problemi riportati sopra, informare il supervisore per ulteriori azioni.

P. RISULTATI

I risultati del test sono calcolati sulla media di un valore di cut-off determinato con la seguente formula:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC medio} + 0.350$$

Il valore trovato per il test è usato per l'interpretazione dei risultati come descritto nel paragrafo successivo.

Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del test sono interpretati come il rapporto tra l'OD450nm del campione e il valore del Cut-Off (o S/Co) in accordo con la seguente tabella:

S/Co	Interpretazione
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equivoco
> 1.1	Positivo

Un risultato negativo indica che il paziente non è stato infettato da HCV o che l'unità di sangue può essere trasfusa.

Quei pazienti che mostrano un risultato equivoco dovrebbero essere testati nuovamente su un campione prelevato 1-2 settimane dopo. L'unità di sangue non dovrebbe essere trasfusa.

Un risultato positivo indica la presenza dell'infezione da HCV, quindi il paziente dovrebbe essere trattato di conseguenza e l'unità di sangue dovrebbe essere scartata.

Note importanti:

1. L'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio.
2. Ogni risultato positivo dovrebbe essere confermato da un metodo alternativo in grado di rilevare gli anticorpi IgG e IgM (test di conferma) prima di formulare una diagnosi di epatite virale.
3. Come dimostrato nella valutazione delle prestazioni del prodotto, l'analisi è in grado di rilevare la sierconversione per anticorpi anti-HCV core prima di alcuni altri kit commerciali. Quindi un risultato positivo, non confermato, con questi kit commerciali, non deve essere escluso, come un risultato falso positivo! Il campione deve essere comunque sottoposto ad un test di conferma.
4. Dal momento che il saggio è in grado di determinare anche anticorpi di classe IgM, potrebbero essere rilevate discrepanze con altri prodotti commerciali per la determinazione di anticorpi anti HCV mancanti di coniugato anti IgM. La reale positività del campione per gli anticorpi HCV dovrebbe essere poi confermata esaminando anche la reattività IgM, importante per la diagnosi dell'infezione HCV.
5. Quando i risultati sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione per non trasferire dati errati.
6. La diagnosi di epatite virale deve essere fatta e riferita al paziente solo da personale medico qualificato.

Un esempio di calcolo è riportato di seguito:

I seguenti dati non devono essere usati al posto dei dati reali ottenuti dall'utilizzatore.

Controllo Negativo: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Valore Medio: 0.020 OD450nm Minore di 0.050 – Accettato

Controllo Positivo: 2.189 OD450nm

Più alto di 1.000 – Accettato

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370

Calibratorer: 0.550 - 0.530 OD450nm

Valore Medio: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S/Co più alto di 1.1 – Accettato

Campione 1: 0.070 OD450nm

Campione 2: 1.690 OD450nm

Campione 1 S/Co < 0.9 = negativo

Campione 2 S/Co > 1.1 = positivo

R. PRESTAZIONI

La Valutazione delle Prestazioni è stata condotta in accordo a quanto riportato in Common Technical Specifications o CTS (art. 5, Capitolo 3 di IVD Direttiva 98/79/EC) e ad entrambe le procedure di incubazione (standard e breve).

1. LIMITE DI RILEVAZIONE

Il limite di rilevazione del saggio è stato calcolato usando la procedura di incubazione breve per mezzo del British Working Standard per anti-HCV, NIBSC codice 06/188-006. La seguente tabella riporta i valori medi di OD450nm di questo standard diluito in plasma negativo e poi esaminato.

Diluizione	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Fattore	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Plasma Negativo	0,25	0,20	0,20

Inoltre il campione codificato Accurun 1 - series 3000 – fornito da Boston Biomedica Inc., USA, è stato valutato “in toto” mostrando i seguenti risultati:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Fattore	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. SPECIFICITA' E SENSIBILITA' DIAGNOSTICHE

La Valutazione delle Prestazioni del dispositivo è stata condotta in un trial esterno condotto su più di 5000 campioni.

2.1 Specificità Diagnostica

E' definita come la probabilità del saggio di segnare negativo in assenza di un analita specifico. Sono stati esaminati un totale di più di 5000 donatori a caso, inclusi donatori per la prima volta.

La specificità diagnostica era accertata contro un kit approvato US FDA.

5043 donatori sono stati testati fornendo una specificità del 99.5%.

210 pazienti ospedalizzati sono stati testati per HCV; è stata trovata una specificità diagnostica del 99.5%. Inoltre, la specificità diagnostica era accertata testando 162 campioni potenzialmente interferenti (altre malattie infettive, anticorpi positivi E.coli, pazienti affetti da malattie epatiche non virali, pazienti in dialisi, donne incinta, emolizzati, lipemici, etc.). E' stato accertato un valore di specificità del 100%.

Non è stata osservata nessuna falsa reattività dovuta al metodo di preparazione dei campioni. Sia plasmi, derivati con differenti tecniche standard di preparazione (citrato, EDTA e eparina), e sieri sono stati usati per determinare i valori di specificità. Sono stati testati campioni congelati, per verificare interferenze dovute alla raccolta e conservazione. Nessuna interferenza è stata osservata.

2.2 Sensibilità Diagnostica

E' definita come la probabilità del saggio di segnare positivo in assenza di un analita specifico. La sensibilità diagnostica è stata accertata esternamente su un numero totale di 348 campioni; una sensibilità diagnostica del 100% è stata trovata. Internamente sono stati testati più di 50 campioni positivi, fornendo ancora un valore di sensibilità diagnostica del 100%.

Sono stati testati campioni positivi da infezioni provocate da genotipi differenti di HCV.

Inoltre è stata studiata la maggior parte dei pannelli di sieroconversione forniti da Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) e Zeptomatrix, USA, (HCV).

I risultati per alcuni di loro sono riportati di seguito.

Pannello	N° campioni	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Nota:

1. Campioni Positivi

2. HCV v.3.0

Infine il prodotto è stato testato sul pannello EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, fornito dall'Etablissement Francais Du Sang (EFS), Francia, con i seguenti risultati:

Pannello EFS Ac HCV

Campione	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Risultati aspettati
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativo
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positivo
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positivo
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positivo
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positivo
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positivo

3. PRECISIONE

E' stata calcolata su cinque campioni, uno negativo e quattro positivi, esaminati in 4 ripetizioni in sei run separate.

I risultati sono riportati di seguito:

Risultati intra-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -
1° Lotto (procedura incubazione breve)

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter Saggio	Intra Saggio	Totale
Negativo	0.03	6.66	10.56	12.48
Positivi	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Risultati intra-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -
1° Lotto (procedura incubazione lunga)

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter Saggio	Intra-Saggio	Totale
Negativo	0.04	4.67	12.34	13.19
Positivi	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Risultati inter-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -
1°, 2° e 3° Lotto (procedura incubazione breve)

Campione	Precisione - %CV		
	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
Negativo	8,65	8,29	6,13
Calibratore	4,98	4,44	5,38
Positivo	4,11	3,11	1,37

La variabilità mostrata nelle tabelle non è risultata nella misclassificazione dei campioni.

S. SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

L'aderenza alla procedura e alle specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione, possono evitare i seguenti tipi di errore:

ERRORE	POSSIBILI CAUSE / SUGGERIMENTI
OD molto diverse ($\pm 50\%$) da quelle riportate nel QC	-errato volume di dispensazione dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente) -errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare l'inizio dell'incubazione) -errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato o del Coniugato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti)

Risultati poco riproducibili	-volume di dispensazione dei reagenti e dei campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio; tararle nuovamente) -errore nell'esecuzione dei lavaggi o della lettura (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti) -inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimento: utilizzare puntali appropriati, contenitori di plastica monouso puliti e acqua distillata o equivalente)
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato	-alcuni reagenti non sono stati dispensati -forte contaminazione del Coniugato o del Substrato -errata esecuzione della procedura del saggio (es. dispensazione accidentale dei reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato, ecc.)
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	-tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppo bassa -errata diluizione del coniugato
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	-errata diluizione del coniugato -tempo di incubazione troppo lungo, temperature di incubazione troppo alta -qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione) -lavaggio non sufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
Inspiegabili risultati	-contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori -lavaggio incostante e insufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
CV% intrasaggio elevato	- reagenti e/o non portate a temperature ambiente prima dell'uso - il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)
CV% intersaggio elevato	-condizioni di incubazione non costanti (tempo, temperatura) -controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione) -variabilità intrinseca degli operatori

T. AUTOMAZIONE

La procedura descritta in questa istruzione per l'uso è solo per il test in manuale. Quando si utilizzano degli analizzatori automatici, bisogna seguire le istruzioni che sono descritte nei manuali d'uso del dispositivo stesso. Ogni laboratorio deve seguire i propri processi di validazione interna dimostrando la compatibilità con i sistemi automatici.

U. LIMITAZIONI

Ripetibili risultati falsi positivi, non confermati dal RIBA di conferma o tecniche simili, sono stati valutati come inferiori allo 0,1% della popolazione normale. I campioni congelati contenenti particelle di fibrina o aggregati dopo scongelamento hanno mostrato di generare falsi positivi.

BIBLIOGRAFIA

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore—an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Należy uważnie przeczytać tę ulotkę przed przeprowadzeniem dozowania i postępować zgodnie z instrukcjami w niej zawartymi.

Przestrzeganie instrukcji jest warunkiem wiarygodności wyników.



Producent:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Mediolan (Włochy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

pl

SYMBOLE ZASTOSOWANE NA ETYKIETACH

Polski PL							
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	Numer katalogowy	Numer partii	Uwaga, przeczytać instrukcję użycia	Limity temperatury	Zużyć w ciągu	Numer próby
				MICROPLATE	CONTROL +	CONTROL -	CAL
	Producent	Chronić przed słońcem	Data produkcji	Mikropłytką	Kontrola dodatnia	Kontrola ujemna	Kalibrator
	CONJ	DIL SPE	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 20X	DIL AS	RCNS x mL
	Koniugat	Rozcieńczalnik próbek badanych	Substrat TMB	Roztwór zatrzymujący reakcję (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	Rozcieńczalnik testowy	Rozpuścić w x mL
	Ryzyko biologiczne	Niebezpieczeństwo	Uwaga				

Uwaga:

Roztwór zatrzymujący reakcję sklasyfikowany jako: Skin Corr. 1A



- Ostrzeżenie:**
Niebezpieczeństwo
- Elementy etykietowania określające zagrożenia:**
Kwas siarkowy
- Zwroty ostrzegawcze:**
H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
- Zwroty określające warunki bezpiecznego stosowania:**
P260 Nie wdychać pyłu / dymu / gazu / mgły / par / rozpylonej cieczy.
P303 + P361 + P353 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem.
P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P310 Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.
P405 Przechowywać pod zamknięciem.
P501 Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi / regionalnymi / krajowymi / międzynarodowymi przepisami.

Uwaga:

Kontrola ujemna, kontrola dodatnia, kalibrator, koniugat rozcieńczalnik próbek badanych, rozcieńczalnik testowy i roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x) sklasyfikowane jako: Skin Sens. 1



- Ostrzeżenie:**
Uwaga
- Elementy etykietowania określające zagrożenia:**
Mieszanina: 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-on [nr EC 247-500-7]; 2-metylo-2H-izotiazol-3-on [nr EC 220-239-6] (3:1)
- Zwroty ostrzegawcze:**
H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.
- Zwroty określające warunki bezpiecznego stosowania:**
P260 Nie wdychać pyłu / dymu / gazu / mgły / par / rozpylonej cieczy.
P280 Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / twarzy.
P321 Zastosować określone leczenie (patrz ... na etykiecie).
P333 + P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady / zgłosić się pod opiekę lekarza.
P302 + P352 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ NA SKÓRĘ: Umyć dużą ilością wody z mydłem.
P501 Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi / regionalnymi / krajowymi / międzynarodowymi przepisami.

Karty charakterystyki są dostępne na stronie www.adaltis.net.

A. CEL STOSOWANIA

Test immunoenzymatyczny (ELISA) czwartej generacji do wykrywania przeciwciał przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu C w osoczu (EDTA, heparyna i cytrynian) i surowicy ludzkiej. Zestaw może być używany do wykrywania przeciwciał w jednostkach krwi pacjentów z HCV.

Tylko do użytku diagnostycznego in vitro.

B. WPROWADZENIE

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) definiuje wirusowe zapalenie wątroby typu C w następujący sposób:

„Wirusowe zapalenie wątroby typu C jest wirusową infekcją wątroby, które określane było jako przenoszone pozajelitowo „zapalenie wątroby typu nie A, nie B” aż do identyfikacji czynnika sprawczego w 1989 roku. Odkrycie i charakterystyka wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) doprowadziły do zrozumienia jego głównej roli w potransfuzyjowym zapaleniu wątroby i jego skłonności do wywoływania uporczywych infekcji.”

Wirus HCV przenoszony jest głównie przez bezpośredni kontakt z ludzką krwią. Głównymi przyczynami HCV na świecie są stosowanie niekontrolowanych jednostek krwi do transfuzji oraz ponowne użycie igieł i strzykawek, które nie zostały odpowiednio wysterylizowane.

Obecnie nie jest dostępna żadna szczepionka, aby zapobiegać wirusowemu zapaleniu wątroby typu C, a leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C jest zbyt kosztowne, aby większość osób w krajach rozwijających się mogła sobie na nie pozwolić. Zatem, z perspektywy globalnej, największy wpływ na ograniczenie liczby chorych na zapalenie wątroby typu C zostanie prawdopodobnie osiągnięty poprzez skupienie wysiłków na zmniejszeniu ryzyka przenoszenia wirusa HCV w obrębie narażeń szpitalnych (np. transfuzje krwi, niebezpieczne praktyki związane z zastrzykami) i zachowań wysokiego ryzyka (np. dożylna zażywanie narkotyków).

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest jednym z wirusów (A, B, C, D i E), które są odpowiedzialne za większość przypadków wirusowego zapalenia wątroby. Jest to otoczkowy wirus RNA należący do rodziny Flaviviridae, wykazujący się wąskim zakresem gospodarzy. Ludzie i szympansy są jedynymi znanymi gatunkami podatnymi na infekcję, a oba te gatunki rozwijają podobną chorobę. Ważną cechą wirusa jest względna zmienność genomu, co prawdopodobnie wiąże się z dużą skłonnością (80%) do wywoływania przewlekłych zakażeń. Wirus HCV dzieli się na kilka odrębnych genotypów, które mogą być ważne w określaniu stopnia nasilenia choroby i reakcji na leczenie.

Okres inkubacji infekcji HCV przed wystąpieniem objawów klinicznych wynosi od 15 do 150 dni. W ostrych infekcjach najczęstszymi objawami są zmęczenie i żółtaczka, jednak większość przypadków (od 60% do 70%), nawet tych, które prowadzą do przewlekłego zapalenia, ma charakter bezobjawowy. U około 80% nowo zakażonych pacjentów zapalenie wątroby przyjmuje postać przewlekłą. Marskość wątroby rozwija się u około od 10% do 20% osób z przewlekłym zapaleniem wątroby, natomiast rak wątroby rozwija się u

od 1% do 5% osób z przewlekłym zapaleniem wątroby w okresie od 20 do 30 lat. Większość pacjentów cierpiących na raka wątroby, którzy nie wykazują zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B, wykazuje zakażenie HCV. Mechanizmy, dzięki którym infekcja HCV prowadzi do raka wątroby, są nadal niejasne. Wirusowe zapalenie wątroby typu C nasila również inne choroby wątroby, z którymi współistnieje. Choroby wątroby postępują szybciej u osób z chorobami wątroby spowodowanymi nadużywaniem alkoholu i zakażeniem HCV. Wirus HCV rozprzestrzenia się głównie przez bezpośredni kontakt z zainfekowaną krwią. Przenoszenie wirusa przez transfuzję krwi, która nie jest badana pod kątem zakażenia HCV, przez ponowne użycie nieodpowiednio wysterylizowanych igieł, strzykawek lub innego sprzętu medycznego, lub poprzez udostępnianie igieł przez użytkowników narkotyków, są dobrze udokumentowanymi czynnikami. Wystąpić może również, choć rzadziej, przenoszenie wirusa drogą płciową i okołoporodową. Inne sposoby przenoszenia wirusa, takie jak praktyki kulturowe, społeczne i behawioralne z zastosowaniem procedur przezskórnych (na przykład przekłuwanie uszu i ciała, obrzezanie, tatuowanie) mogą wystąpić, jeśli stosuje się nieodpowiednio sterylizowany sprzęt. Wirus HCV nie rozprzestrzenia się przez kichanie, przytulanie, kaszel, jedzenie lub wodę, używanie wspólnych sztućców lub przypadkowy kontakt.

Zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się, grupy wysokiego ryzyka obejmują osoby zażywające narkotyki drogą dożylną, biorców niebadanej krwi, chorych na hemofilię, pacjentów dializowanych oraz osoby z wieloma partnerami seksualnymi, które uprawiają seks bez zabezpieczenia. W krajach rozwiniętych szacuje się, że 90% osób z przewlekłą infekcją HCV to osoby obecnie lub wcześniej przyjmujące narkotyki drogą dożylną oraz osoby, które przeszły transfuzję niezbadanej krwi lub produktów krwiopochodnych. W wielu krajach rozwijających się, w których nadal stosuje się niebadaną krew i produkty krwiopochodne, głównymi drogami przenoszenia są niesterylizowane urządzenia do iniekcji i transfuzje niebadanej krwi. Ponadto osoby, które stosują tradycyjne praktyki w zakresie skaryfikacji i obrzezania, są zagrożone, jeśli używają lub ponownie wykorzystują niesterylne narzędzia.

WHO szacuje, że około 170 milionów ludzi, czyli 3% światowej populacji, jest zakażonych wirusem HCV i są oni narażeni na ryzyko rozwoju marskości wątroby i/lub raka wątroby. Częstotliwość występowania zakażeń wirusem HCV w Afryce, na Bliskim Wschodzie, w Azji Południowo-Wschodniej i Zachodnim Pacyfiku jest wysoka w porównaniu z Ameryką Północną i Europą.

Testy diagnostyczne na obecność wirusa HCV są stosowane w celu zapobiegania infekcjom poprzez badanie przesiewowe krwi i osocza dawcy, w celu ustalania diagnozy klinicznej i podejmowania lepszych decyzji dotyczących postępowania medycznego w przypadku danego pacjenta. Testy diagnostyczne dostępne obecnie na rynku bazują na odczynach immunosorbcyjnych (EIA) do wykrywania przeciwciał swoistych wobec HCV. System EIA może wykryć ponad 95% chronicznie zainfekowanych pacjentów, ale tylko 50% do 70% ostrych infekcji. Rekombinowany test

immunoblot (RIBA), który identyfikuje przeciwciała reagujące z poszczególnymi antygenami HCV, jest często stosowany jako test uzupełniający dla potwierdzenia pozytywnego wyniku EIA. Test na obecność krążenia wirusa HCV w oparciu o amplifikację RNA (np. reakcja łańcuchowa polimerazy PCR, test bDNA) jest również wykorzystywany do potwierdzenia wyników badań serologicznych, a także do oceny skuteczności terapii przeciwwirusowej. Wynik pozytywny wskazuje na obecność czynnej infekcji i możliwość rozprzestrzeniania się infekcji i/lub rozwoju przewlekłej choroby wątroby.

Leki przeciwwirusowe, takie jak interferon stosowany samodzielnie lub w połączeniu z rybawiryną, mogą być stosowane w leczeniu osób z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, ale koszt takiego leczenia jest bardzo wysoki. Leczenie samym interferonem jest skuteczne u około 10–20% pacjentów. Interferonu w połączeniu z rybawiryną jest skuteczny u 30–50% pacjentów. Rybawiryna nie wydaje się być skuteczna, gdy jest stosowana samodzielnie.

Nie ma skutecznej szczepionki przeciwko HCV. Badania są w toku, ale wysoka zmienność genomu HCV komplikuje rozwój szczepionki. Brak wiedzy na temat jakiegokolwiek ochronnej odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu HCV również utrudnia badania nad szczepionkami. Nie wiadomo, czy układ odpornościowy jest w stanie wyeliminować wirusa.

Jednakże, kilka badań wykazało obecność przeciwciał neutralizujących wirusa u pacjentów z HCV. W przypadku braku szczepionki należy zastosować wszelkie środki ostrożności, aby uniknąć zakażenia, w tym (a) badania przesiewowe krwi i produktów krwiopochodnych, (b) inaktywowanie wirusa w osoczu i produktach pochodnych, (c) zaostreżenie i utrzymanie praktyk w zakresie kontroli zakażeń w placówkach opieki zdrowotnej, takich jak odpowiednia sterylizacja instrumentów medycznych i stomatologicznych, (d) promowanie zmiany zachowania wśród ogółu społeczeństwa i pracowników służby zdrowia w celu zmniejszenia nadużywania zastrzyków i stosowania bezpiecznych praktyk wykonywania iniekcji; (e) doradztwo w zakresie redukcji ryzyka dla osób zażywających narkotyki i stosujących praktyki seksualne wysokiego ryzyka.”

Genom wirusa koduje składniki strukturalne, białko nukleokapsydu i glikoproteiny otoczki oraz składniki funkcjonalne zaangażowane w replikację wirusa i przetwarzanie jego białek. Region kodujący nukleokapsyd wydaje się najbardziej konserwatywny spośród izolatów uzyskanych na świecie.

C. ZASADA TESTU

Mikropłytki są pokryte specyficznymi dla HCV antygenami pochodzącymi z regionów „rdzenia” i „ns” kodującymi konserwatywne i immunodominujące determinanty antygenowe (peptyd rdzenia, rekombinowane peptydy NS3, NS4 i NS5).

Faza stała jest najpierw traktowana rozcieńczoną próbką, a ewentualnie obecne przeciwciała HCV są wychwytywane przez antygeny. Po wypłukaniu wszystkich innych składników próbki, w drugiej inkubacji, po wychwyceniu przeciwciał HCV, wykrywane są

przeciwciała IgG i IgM przez dodanie specyficznych przeciwciał poliklonalnych przeciw IgG i IgM, znakowanych peroksydazą (HRP).

Enzym wychwycony w fazie stałej, w reakcji z mieszaniną substratu TMB generuje sygnał optyczny, który jest proporcjonalny do ilości przeciwciał HCV obecnych w próbce. Wartość odcięcia pozwala nam interpretować gęstości optyczne dla pozytywnych i negatywnych wyników na obecność przeciwciał HCV.

D. KOMPONENTY

Zestaw zawiera odczynniki dla 96 testów (kod 071067), 192 testów (kod 071064) lub 480 testów (kod 071068).

Mikropłytki	1
Kontrola ujemna	1x4 mL/fiolka
Kontrola dodatnia	1x2 mL/fiolka
Kalibrator	2 fiołki
Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	1x50 mL/fiolka
Koniugat	1x16 mL/fiolka
Rozcieńczalnik próbek badanych	1x50 mL/fiolka
Substrat TMB	1x16 mL/fiolka
Roztwór zatrzymujący reakcję	1x15 mL/fiolka
Rozcieńczalnik testowy	1x8 mL/fiolka
Folie uszczelniające płytki	2
Liczba testów	96
Kod	071067

Mikropłytki	2
Kontrola ujemna	2x4 mL/fiolka
Kontrola dodatnia	1x4 mL/fiolka
Kalibrator	3 fiołki
Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	2x50 mL/fiolka
Koniugat	2x16 mL/fiolka
Rozcieńczalnik próbek badanych	2x50 mL/fiolka
Substrat TMB	2x16 mL/fiolka
Roztwór zatrzymujący reakcję	2x15 mL/fiolka
Rozcieńczalnik testowy	2x8 mL/fiolka
Folie uszczelniające płytki	4
Liczba testów	192
Kod	071064

Mikropłytki	5
Kontrola ujemna	1x20 mL/fiolka
Kontrola dodatnia	1x10 mL/fiolka
Kalibrator	7 fiołki
Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	5x50 mL/fiolka
Koniugat	2x40 mL/fiolka
Rozcieńczalnik próbek badanych	5x50 mL/fiolka
Substrat TMB	2x40 mL/fiolka
Roztwór zatrzymujący reakcję	2x40 mL/fiolka
Rozcieńczalnik testowy	1x40 mL/fiolka
Folie uszczelniające płytki	10
Liczba testów	480
Kod	071068

1. Mikropłytki

12 pasków po 8 mikrostudzienek powleczonych peptydem rdzeniowym i rekombinowanymi peptydami NS3, NS4 i NS5. Płytki są szczelnie zamknięte w torebce aluminiowej ze środkiem osuszającym.

Doprowadzić mikropłytkę do temperatury pokojowej (18...24°C) przed otwarciem torebki. Nieużywane paski

włożyć z powrotem do torebki. Torebkę należy uszczelnić i przechowywać w temperaturze 2...8°C, z zawartością środka osuszającego.

2. Kontrola ujemna

Kontrola gotowa do użycia. Zawiera 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1, 2% kazeiny i 0,1% środka konserwującego Proclin 150. Kontrola ujemna jest kodowana w kolorze oliwkowym.

3. Kontrola dodatnia

Kontrola gotowa do użycia. Zawiera 1% białka surowicy koziej, przeciwciała ludzkie dodatnie wobec HCV, 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1, 0,5% Tween 20, 0,09% azydku sodu i 0,1% Proclin 150 jako środki konserwujące. Kontrola dodatnia jest kodowana w kolorze ciemnozielonym.

Ważna informacja: Brak żywotnych patogenów w kontroli dodatniej nie może być w pełni zapewniony, dlatego też odczynnik ten należy traktować jako potencjalnie niebezpieczny biologicznie, zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.

4. Kalibrator

Kalibrator liofilizowany. Do rozpuszczonego w objętości wody klasy EIA podanej na etykiecie. Zawiera białka płodowe surowicy bydłowej, ludzkie przeciwciała anty HCV, których zawartość jest skalibrowana według normy roboczej NIBSC kod 06/188-006, 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1, 0,3 mg/mL siarczanu gentamycyny i 0,1% Proclin 150 jako środki konserwujące.

Ważna informacja: Brak żywotnych patogenów w kalibratorze nie może być w pełni zapewniony, dlatego też odczynnik ten należy traktować jako potencjalnie niebezpieczny biologicznie, zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.

Uwaga: objętość konieczna do rozpuszczenia zawartości fiołki może się różnić w zależności od partii. Stosować właściwą objętość podaną na etykiecie.

5. Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)

Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x). Po rozcieńczeniu roztwór do płukania (roztwór buforu do płukania) zawiera 10 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 ± 0,2, 0,05% Tween 20 i 0,05% Proclin 150. Po rozcieńczeniu roztwór do płukania zachowuje stabilność przez 1 tydzień w temperaturze 2...8°C.

6. Koniugat

Gotowy do użycia odczynnik w kolorze czerwonym. Zawiera peroksydazę chrzanową sprzężoną z kozimi przeciwciałami poliklonalnymi dla ludzkich przeciwciał IgG i IgM, 5% BSA, 10 mM buforu cytrynianowego o pH 6,4 ± 0,1, 0,1% Proclin i 0,05% Tween 20 jako środki konserwujące.

7. Substrat TMB

Składnik gotowy do użycia. Zawiera 50 mM buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH 3,5-3,8, 4% dimetylosulfotlenku, 0,03% tetra-metylobenzyny (TMB) i 0,02% nadtlenu wodoru (H₂O₂). Delikatnie wymieszać przed użyciem.

Uwaga: Należy przechowywać z dala od światła, składnik wrażliwy na silne oświetlenie.

8. Rozcieńczalnik testowy

Składnik gotowy do użycia. Zawiera kozią surowicę, 10 mM roztworu buforowanego TRIS o pH 8,0 ± 0,1 zawierającego 0,1% Proclin 150 i 0,09% azydku sodu do wstępnej obróbki próbek i kontroli w płytce, blokującego zakłócenia.

9. Roztwór zatrzymujący reakcję

Składnik gotowy do użycia.

Zawiera roztwór 0,3 M H₂SO₄. Delikatnie wymieszać przed użyciem.

10. Rozcieńczalnik próbek badanych

Gotowy do użycia odczynnik w kolorze ciemnozielonym. Zawiera 1% kazeiny, 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1 i 0,1% środka konserwującego Proclin 150. Stosować do rozcieńczania próbki.

Uwaga: Rozcieńczalnik w obecności próbki zmienia kolor z oliwkowego na ciemny niebiesko-zielony.

E. MATERIAŁY WYMAGANE ALE NIE DOSTARCZANE Z ZESTAWEM

1. Kalibrowane mikropipety (200 µL i 10 µL) i jednorazowe końcówki.
2. Woda klasy EIA (podwójnie destylowana lub dejonizowana, poddana obróbce węglem aktywnym w celu usunięcia chemicznych utleniaczy stosowanych jako środki dezynfekujące).
3. Timer z interwałem czasowym 60 min lub więcej.
4. Arkusze bibuły chłonnej.
5. Termostatyczny inkubator skalibrowany dla mikropłytek ELISA, zdolny do zapewnienia temperatury +37°C.
6. Skalibrowany czytnik mikrostudzienek ELISA z filtrem 450 nm (odczyt) i ewentualnie z filtrem 620-630 nm (studzienka pusta).
7. Skalibrowana płuczka mikropłytek ELISA.
8. Wortex lub podobny przyrząd mieszający.

F. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Zestaw powinien być stosowany wyłącznie przez odpowiednio przeszkolony personel pod nadzorem lekarza medycyny nadzorującego laboratorium. Należy uważnie przeczytać tę ulotkę przed przeprowadzeniem testu i postępować zgodnie z instrukcjami w niej zawartymi.
2. Należy uważnie zapoznać się z kartą charakterystyki przed użyciem produktu.
3. Gdy zestaw jest używany do badania przesiewowego jednostek krwi i składników krwi, musi być używany w laboratorium certyfikowanym i kwalifikowanym przez odpowiedni organ krajowy (Ministerstwo Zdrowia lub podobny podmiot) do przeprowadzania badań tego rodzaju.
4. Cały personel biorący udział w przeprowadzaniu oznaczania musi nosić ochronne ubrania laboratoryjne, rękawice bez talku i okulary ochronne. Należy unikać używania jakichkolwiek ostrych (igieł) lub tnących (ostrzy) urządzeń. Cały zaangażowany personel powinien zostać przeszkolony w zakresie procedur bezpieczeństwa biologicznego zgodnie z zaleceniami Centrum Kontroli Chorób w Atlancie

(USA) i zaleceniami w publikacji Narodowego Instytutu Zdrowia (USA): „Bezpieczeństwo biologiczne w laboratoriach mikrobiologicznych i biomedycznych”, wyd. 1984.

5. Cały personel zajmujący się obsługą próbek powinien zostać zaszczepiony na obecność HBV i HAV, dla których dostępne i bezpieczne są skuteczne szczepionki.
6. Środowisko laboratoryjne powinno być kontrolowane w taki sposób, aby uniknąć zanieczyszczeń takich jak kurz lub bakterie przenoszone w powietrzu podczas otwierania fiolek i mikroplatek zestawu oraz podczas wykonywania testu. Chronić substrat (TMB) przed silnym światłem i unikać drgań powierzchni stołu, na którym przeprowadzany jest test.
7. Po otrzymaniu zestaw przechowywać w temperaturze +2...8°C w lodówce lub w chłodni z regulowaną temperaturą.
8. Nie zamieniać składników między różnymi partiami zestawów. Zaleca się, aby składniki między dwoma zestawami z tej samej partii nie były wymieniane.
9. Sprawdzić, czy odczynniki są czyste i nie zawierają widocznych dużych cząstek lub agregatów. W przeciwnym razie należy zgłosić kierownikowi laboratorium, aby zainicjował niezbędne procedury wymiany zestawu.
10. Unikać wzajemnego zanieczyszczania próbek surowicy / osocza, używając jednorazowych końcówek i zmieniając je po każdej próbce.
11. Unikać wzajemnego zanieczyszczania odczynników zestawu, używając jednorazowych końcówek i zmieniając je po zastosowaniu każdego składnika.
12. Nie należy używać zestawu po upływie daty ważności podanej na opakowaniu zewnętrznym i etykietach wewnętrznych (fiolkach).
13. Traktować wszystkie próbki jako potencjalnie zainfekowane. Wszystkie ludzkie surowice powinny być traktowane zgodnie z poziomem 2 bezpieczeństwa biologicznego, zgodnie z zaleceniami Centrum Kontroli Chorób w Atlancie (USA), a także z zaleceniami w publikacji Narodowego Instytutu Zdrowia (USA): „Bezpieczeństwo biologiczne w laboratoriach mikrobiologicznych i biomedycznych”, wyd. 1984.
14. Przy przygotowywaniu płynnych składników lub w przypadku przenoszenia składników na zautomatyzowane stacje robocze zalecane jest stosowanie jednorazowych plastikowych naczyń w celu niedopuszczenia do zanieczyszczenia krzyżowego.
15. Odpady powstałe w trakcie użytkowania zestawu muszą być usuwane zgodnie z krajowymi dyrektywami i przepisami dotyczącymi laboratoryjnych odpadów chemicznych i biologicznych. Odpady płynne powstające w wyniku czyszczenia, pozostałości substancji kontrolnych i próbek należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny, który należy inaktywować przed usunięciem. Sugerowane procedury inaktywacji to poddanie działaniu podchlorynu sodu o stężeniu 10% przez 16-18 godzin lub inaktywacja cieplna w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min.
16. Przypadkowe wycieki z próbek podczas operacji muszą zostać zaadsorbowane bibułą chłonną nasączoną podchlorynem sodu, a następnie

splukane wodą. Bibułę chłonną należy następnie wyrzucić do właściwych pojemników przeznaczonych na odpady biologiczne.

17. Roztwór zatrzymujący reakcję zawiera 0,3 M kwasu siarkowego. Unikać kontaktu ze skórą i oczami. W przypadku kontaktu preparatu z oczami, przemyć oczy obfitą ilością wody.
18. Roztwory odczynnika zawierające azydek sodu lub tiomersalu jako środki konserwujące należy traktować zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa obowiązującymi w kraju stosowania. Usuwanie roztworów zawierających azydek sodu polega na zastosowaniu dużych ilości bieżącej wody. Należy zwrócić uwagę na fakt, że azydek sodu może tworzyć związki wybuchowe w dłuższym kontakcie z ołowiem i miedzią.
19. Nie palić, nie jeść i nie stosować kosmetyków w obszarach, w których obsługiwane są próbki i odczynniki.
20. Inne materiały odpadowe powstałe w wyniku użycia zestawu (przykład: końcówki używane do próbek i kontroli, użyte mikroplatek) powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne i usuwane zgodnie z krajowymi dyrektywami i przepisami dotyczącymi odpadów laboratoryjnych.
21. Pipetowanie cieczy poprzez zasysanie ustami jest zabronione.

G. PRÓBKİ: PRZYGOTOWANIE I ZALECENIA

1. Krew pobierana jest w warunkach aseptycznych przez nakłucie żyły, natomiast osocze lub surowicę przygotowuje się, stosując standardowe techniki przygotowywania próbek do klinicznej analizy laboratoryjnej. Nie zaobserwowano żadnych wpływów podczas przygotowania próbki z zawartością cytrynianu, EDTA i heparyny.
2. Unikać jakiegokolwiek dodawania środków konserwujących do próbek; zwłaszcza azydku sodu, który może wpływać na aktywność enzymatyczną koniugatu, generując fałszywe wyniki negatywne.
3. Probki muszą być wyraźnie oznaczone kodami lub nazwami, aby nie dopuścić do nieporozumień w interpretacji wyników. Gdy zestaw jest używany do badań przesiewowych jednostek krwi, zaleca się etykiety z kodami kreskowymi i odczyt elektroniczny.
4. Hemolizowane (czerwone) i widocznie hiperlipemiczne („mleczne”) próbki muszą zostać odrzucone, ponieważ mogą generować fałszywe wyniki. Probki zawierające pozostałości fibryny lub duże cząstki, lub włókna i cząstki mikrobiologiczne należy usunąć, ponieważ mogą prowadzić do fałszywych wyników.
5. Surowicę i osocze można przechowywać w temperaturze +2...8°C przez do pięciu dni po pobraniu. W przypadku dłuższego przechowywania próbki mogą być zamrożone w temperaturze -20°C przez kilka miesięcy. Wszelkie zamrożone próbki nie powinny być zamrożone i rozmrożone więcej niż jeden raz, gdyż może to generować powstawanie cząsteczek, które mogą wpływać na wynik testu.
6. Jeżeli cząstki są obecne, wirować z prędkością 2000 obr./min przez 20 min. lub filtrować przy użyciu filtrów 0,2-0,8µm, aby oczyścić testowaną próbkę.

H. PRZYGOTOWANIE SKŁADNIKÓW I OSTRZEŻENIA

Badanie przeprowadzone na otwartym zestawie nie wykazało żadnej istotnej utraty aktywności do 1 ponownego użycia materiału w ciągu 6 miesięcy.

1. Mikropłytki:

Doprowadzić mikropłytkę do temperatury pokojowej (na przynajmniej 1 godzinę) przed otwarciem torebki. Sprawdzić, czy środek osuszający nie zmienił koloru na ciemnozielony, wskazując na wady w produkcji. W tym przypadku skontaktować się z biurem obsługi klienta firmy Adaltis.

Nie używane paski należy umieścić z powrotem w aluminiowym opakowaniu, z dołączonym środkiem suszącym, odpowiednio zamknąć na zamek i przechowywać w temperaturze +2...8°C. Po pierwszym otwarciu pozostałe paski pozostają stabilne, dopóki wskaźnik wilgotności wewnątrz torebki ze środkiem osuszającym nie zmieni koloru z żółtego na zielony.

2. Kontrola ujemna:

Gotowa do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

3. Kontrola dodatnia:

Gotowa do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem. Traktować ten składnik jako potencjalnie zainfekowany.

4. Kalibrator:

Dokładnie rozpuścić zawartość liofilizowanej fiołki w objętości wody klasy EIA podanej na etykiecie. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

Traktować ten składnik jako potencjalnie zainfekowany.

Uwaga: Po rozpuszczeniu kalibrator nie jest stabilny. Przechowywać w porcjach w temperaturze -20°C.

5. Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x) (fiołka da 50 mL):

Całą zawartość roztworu do płukania w formie koncentratu 20x należy rozcieńczyć wodą destylowaną do 1000 mL (objętość pokazano na etykiecie) i delikatnie wymieszać przed użyciem. Ponieważ roztwór może zawierać krystaliczne cząstki, należy uważać, aby rozpuścić całą zawartość. Podczas przygotowania należy unikać spieniania, ponieważ obecność pęcherzyków może wpłynąć na wydajność płukania.

Uwaga: Po rozcieńczeniu roztwór do płukania zachowuje stabilność przez 1 tydzień w temperaturze +2...8°C.

6. Koniugat:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem. Należy uważać, aby nie zanieczyścić płynu utleniającymi substancjami chemicznymi, pyłami lub mikroorganizmami obecnymi w powietrzu. Jeśli składnik ma być przeniesiony, używać tylko plastikowych, możliwie sterylnych pojemników.

7. Substrat TMB:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem. Należy uważać, aby nie zanieczyścić płynu utleniającymi substancjami chemicznymi, pyłami lub mikroorganizmami obecnymi w powietrzu. Nie narażać na silne oświetlenie, środki utleniające i kontakt z

powierzchniami metalowymi. Jeśli składnik ma być przeniesiony, używać tylko plastikowych, możliwie sterylnych pojemników.

8. Rozcieńczalnik testowy:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

9. Roztwór zatrzymujący reakcję:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

10. Rozcieńczalnik próbek badanych:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

I. PRZYZRZĄDY STOSOWANE W POŁĄCZENIU Z ZESTAWEM

1. Mikropipety muszą być odpowiednio skalibrowane w celu zapewnienia właściwych objętości wymaganych dla oznaczania i muszą być poddawane regularnej dekontaminacji (alkohol denaturowany, 10% roztwór wybielacza, środki dezynfekujące klasy szpitalnej) pod kątem tych części, które mogłyby wejść w przypadkowy kontakt z próbką. Powinny być również regularnie kontrolowane w celu zapewnienia wykazywania dokładności 1% i dokładności $\pm 2\%$. Odkazanie wycieków lub pozostałości składników zestawu powinno być przeprowadzane regularnie.
2. Inkubator ELISA musi być ustawiony na +37°C (tolerancja $\pm 0,5^\circ\text{C}$) i regularnie sprawdzany, aby zapewnić utrzymanie prawidłowej temperatury. Zarówno suche inkubatory, jak i łaźnie wodne są odpowiednie do inkubacji, pod warunkiem, że dany instrument jest zatwierdzony do inkubacji testów ELISA.
3. Płuczka ELISA jest niezwykle ważna dla ogólnych wyników oznaczania. Płuczkę należy starannie sprawdzić i prawidłowo zoptymalizować. Zwykle 4-5 cykli płukania (zasysanie + dozowanie 350 μL /studzienkę roztworu do płukania = 1 cykl) wystarczy, aby zapewnić, że oznaczanie będzie przebiegało zgodnie z oczekiwaniami. Sugeruje się namaczania trwające 20-30 sekund między cyklami. Aby poprawnie ustawić ich liczbę, zaleca się przeprowadzenie próby za pomocą zestawu kontrolnego zawierającego kontrole z zestawu i próbki referencyjne odpowiednio scharakteryzowane jako ujemne i dodatnie, a także sprawdzenie, czy wartości podane poniżej w sekcji O „Wewnętrzna kontrola jakości” są zgodne. Regularna kalibracja dostarczanych objętości i konserwacja płuczki (odkazanie i czyszczenie igieł) musi być przeprowadzana zgodnie z instrukcjami producenta.
4. Tolerancja czasów inkubacji wynosi $\pm 5\%$.
 - ✓ Metoda krótkiej inkubacji (dla 1. i 2. inkubacji tolerancja wynosi od 43 do 47 min., dla 3. inkubacji tolerancja wynosi od 14 do 16 min.).
 - ✓ Metoda inkubacji standardowej (dla 1. inkubacji tolerancja wynosi od 57 do 63 min., dla 2. i 3. inkubacji tolerancja wynosi od 29 do 31 min.).
5. Czytnik mikropłytek ELISA musi być wyposażony w filtr odczytu 450 nm i idealnie drugi filtr (620-630 nm) do celów odczytu studzienki pustej. Jego

standardowa wydajność powinna wynosić (a) szerokość pasma ≤ 10 nm; (b) zakres absorpcji od 0 do $\geq 2,0$; (c) liniowość $\geq 2,0$; powtarzalność $\geq 1\%$. Odczyt studzienki pustej przeprowadza się zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w sekcji „Procedura przeprowadzania testu”. Układ optyczny czytnika musi być regularnie kalibrowany w celu zapewnienia prawidłowego pomiaru gęstości optycznej. Należy przeprowadzać regularne konserwacje zgodnie z instrukcjami producenta.

6. Podczas korzystania z automatycznego stanowiska ELISA wszystkie krytyczne kroki (dozowanie, inkubacja, płukanie, odczyt, wstrząsanie, przetwarzanie danych) muszą być starannie ustawione, skalibrowane, kontrolowane i regularnie korygowane, aby zapewnić ich zgodność z wartościami podanymi w punktach O „Wewnętrzna kontrola jakości”. Protokół testu musi zostać zainstalowany w systemie operacyjnym urządzenia i zatwierdzony podobnie, jak w przypadku płuczki i czytnika. Ponadto część stacji obsługująca składniki ciekłe (dozowanie i płukanie) musi być kontrolowana i prawidłowo ustawiona. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie dopuścić do przenoszenia przez igły używane do dozowania próbek i płukania. Należy przeprowadzać odpowiednie badania i kontrole, aby zminimalizować możliwość skażenia sąsiednich studzienek z powodu silnie reaktywnych próbek, co doprowadzi do uzyskania fałszywych wyników pozytywnych. Zaleca się stosowanie automatycznych stacji roboczych ELISA do badań przesiewowych krwi i gdy liczba próbek do zbadania przekracza 20-30 jednostek na przebieg.

L. KONTROLE I OPERACJE PRZEPROWADZANE PRZED TESTEM

1. Sprawdzić datę ważności zestawu wydrukowaną na etykiecie na zewnątrz pudełka. Nie używać przeterminowanych zestawów.
2. Sprawdzić, czy ciekłe składniki nie są zanieczyszczone cząstkami lub agregatami widocznymi gołym okiem. Sprawdzić, czy substrat TMB jest bezbarwny lub bładoniebieski poprzez odessanie jego małej objętości za pomocą przezroczystej jałowej, plastikowej pipety. Sprawdzić, czy podczas transportu nie doszło do pęknięcia opakowania i czy wewnątrz pojemnika nie ma wycieku płynu. Sprawdzić, czy torebka aluminiowa zawierająca mikropłytki, nie jest przebita lub uszkodzona.
3. Rozcieńczyć całą zawartość roztworu buforu do płukania (koncentrat 20x), jak opisano powyżej.
4. Rozpuścić kalibrator, jak opisano powyżej.
5. Pozwolić, aby wszystkie składniki zestawu osiągnęły temperaturę pokojową (przez około 1 godzinę), a następnie wymieszać zgodnie z opisem.
6. Ustawić inkubator ELISA na temperaturę $+37^{\circ}\text{C}$ i przygotować płuczkę ELISA przez zalanie jej rozcieńczonym roztworem do płukania, zgodnie z instrukcjami producenta. Ustawić prawidłową liczbę cykli płukania jak podano w sekcji I.3.
7. Sprawdzić, czy czytnik ELISA jest włączony przez co najmniej 20 minut przed odczytem.

8. W przypadku używania automatycznej stacji roboczej, włączyć ją, sprawdzić ustawienia i upewnić się, że zastosowano właściwy protokół testu.
9. Sprawdzić, czy mikropipety są ustawione na wymaganą objętość.
10. Sprawdzić, czy wszystkie wymagane urządzenia są dostępne i gotowe do użycia.
11. W przypadku problemów nie przystępować do testu i poinformować przełożonego.

M. PROCEDURA PRZEPROWADZANIA TESTU

Oznaczanie należy przeprowadzić zgodnie z poniższym opisem, uważając, aby utrzymać ten sam czas inkubacji dla wszystkich oznaczanych próbek.

Procedura oznaczania może być przeprowadzona z zastosowaniem dwóch różnych procedur inkubacji. Wybrać procedurę zgodną z obowiązującymi rozporządzeniami:

1. Inkubacja standardowa (1. inkubacja 60 minut, 2. i 3. inkubacja 30 minut)
2. Inkubacja krótka (1. i 2. inkubacja 45 minut, 3. inkubacja 15 minut)

1. Inkubacja standardowa – Oznaczanie ręczne:

1. Umieścić wymaganą liczbę mikrostudzienek w uchwycie mikrostudzienek. Pozostawić pierwszą mikrostudzienkę pustą dla operacji odczytu studzienki pustej.
2. Dozować 200 μL kontroli ujemnej w trzech powtórzeniach, 200 μL kalibratora w dwóch powtórzeniach i 200 μL kontroli dodatniej w trybie pojedynczym do odpowiednich mikrostudzienek. Nie rozcieńczać kontroli i kalibratora, ponieważ są wstępnie rozcieńczone i gotowe do użycia!
3. Dodać 200 μL rozcieńczalnika do wszystkich studzienek z próbkami; następnie odmierzyć 10 μL próbki do każdej prawidłowo zidentyfikowanej studzienki. Delikatnie wstrząsnąć płytką, unikając przelewania i zanieczyszczania przyległych studzienek, aby całkowicie rozpuścić próbkę w rozcieńczalniku.

Ważna informacja: Upewnić się, że kolor rozcieńczalnika próbek badanych, po dodaniu próbki, zmienia się z jasnozielonego na ciemny zielononiebieski, co oznacza, że dodano próbkę.

4. Dodać 50 μL rozcieńczalnika próbek badanych do wszystkich studzienek z kontrolami/kalibratorem i próbkami. Sprawdzić, czy kolor próbek zmienił się na ciemnoniebieski.
5. Inkubować mikropłytkę przez **60 min. w $+37^{\circ}\text{C}$** .
Ważna informacja: Paski powinny być pokryte dostarczoną folią samoprzylepną tylko wtedy, gdy test przeprowadza się ręcznie. Nie przykrywać pasków podczas korzystania z automatycznych przyrządów ELISA.
6. Oplukać mikropłytkę za pomocą automatycznej płuczki, dozując i zasysając 350 μL /studzienkę rozcieńczonego roztworu do płukania, jak podano w sekcji I.3.
7. Odmierzyć pipetą 100 μL koniugatu enzymatycznego do każdej studzienki, za wyjątkiem pierwszej studzienki pustej, i przykryć folią samoprzylepną.

Sprawdzić, czy czerwony barwnik został dodany do wszystkich studzienek z wyjątkiem A1.

Ważna informacja: Należy uważać, aby nie dotknąć plastikowej powierzchni wewnętrznej studzienki za pomocą końcówki wypełnionej koniugatem. Ryzyko zanieczyszczenia.

8. Inkubować mikropłytkę przez **30 min. w +37°C**.
9. Przepłukać studzienki zgodnie z instrukcjami w punkcie I.3.
10. Odmierzyć pipetą 100 µL mieszaniny substratu TMB do każdej studzienki, a także do studzienki pustej. Inkubować mikropłytkę **w temperaturze pokojowej (18...24°C) przez 30 minut**.

Ważna informacja: Nie wystawiać na działanie silnego bezpośredniego oświetlenia. Ryzyko wygenerowania wysokiego poziomu tła.

11. Odmierzyć pipetą 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję do każdej studzienki, stosując tę samą sekwencję pipetowania co w etapie 10, aby zatrzymać reakcję enzymatyczną. Dodanie roztworu zatrzymującego reakcję zmieni kolor kontroli dodatniej i pozytywnych próbek z niebieskiego na żółty.
12. Zmierzyć intensywność koloru roztworu w każdej studzience, jak opisano w sekcji 1.5, za pomocą filtra 450 nm (odczyt), i możliwie za pomocą filtra 620-630 nm (studzienka pusta) w pozycji A1 na mikropłytkę.

Ważne informacje:

1. Jeśli drugi filtr nie jest dostępny, upewnić się, że na spodzie mikrostudzienki nie widać odcisków palców przed dokonaniem odczytu za pomocą filtra o długości fali 450 nm. Odciski palców mogą generować fałszywe pozytywne wyniki podczas odczytu.
2. Odczyt należy wykonać natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję i zdecydowanie nie później niż 20 minut po jego dodaniu. Nastąpić może również lekkie samoutlenienie substratu, prowadzące do wyższego poziomu tła.
3. Wykazano, że wstrząsanie przy 350 ± 150 obr./min. podczas inkubacji zwiększa czułość testu o około 20%.

2. Inkubacja krótka – Oznaczanie ręczne:

1. Umieścić wymaganą liczbę mikrostudzienek w uchwycie mikrostudzienek. Pozostawić pierwszą mikrostudzienkę pustą dla operacji odczytu studzienki pustej.
2. Dozować 200 µL kontroli ujemnej w trzech powtórzeniach, 200 µL kalibratora w dwóch powtórzeniach i 200 µL kontroli dodatniej w trybie pojedynczym do odpowiednich mikrostudzienek. Nie rozcieńczać kontroli i kalibratora, ponieważ są wstępnie rozcieńczone i gotowe do użycia!
3. Dodać 200 µL rozcieńczalnika do wszystkich studzienek z próbkami; następnie odmierzyć 10 µL próbki do każdej prawidłowo oznaczonej studzienki. Delikatnie wstrząsnąć płytką, unikając przelewania i zanieczyszczenia przyległych studzienek, aby całkowicie rozpuścić próbkę w rozcieńczalniku.

Ważna informacja: Upewnić się, że kolor rozcieńczalnika próbek badanych, po dodaniu próbki, zmienia się z jasnozielonego na ciemny zielono-niebieski, co oznacza, że dodano próbkę.

4. Dodać 50 µL rozcieńczalnika próbek badanych do wszystkich studzienek z kontrolami/kalibratorem i próbkami. Sprawdzić, czy kolor próbek zmienił się na ciemnoniebieski.
5. Inkubować mikropłytkę przez **45 min. w +37°C**.
Ważna informacja: Paski powinny być pokryte dostarczoną folią samoprzylepną tylko wtedy, gdy test przeprowadza się ręcznie. Nie przykrywać pasków podczas korzystania z automatycznych przyrządów ELISA.
6. Oplukać mikropłytkę za pomocą automatycznej płuczki, dozując i zasysając 350 µL/studzienkę rozcieńczonego roztworu do płukania, jak podano w sekcji I.3.
7. Odmierzyć pipetą 100 µL koniugatu enzymatycznego do każdej studzienki, za wyjątkiem pierwszej studzienki pustej, i przykryć folią samoprzylepną. Sprawdzić, czy czerwony barwnik został dodany do wszystkich studzienek z wyjątkiem A1.

Ważna informacja: Należy uważać, aby nie dotknąć plastikowej powierzchni wewnętrznej studzienki za pomocą końcówki wypełnionej koniugatem. Ryzyko zanieczyszczenia.

8. Inkubować mikropłytkę przez **45 min. w +37°C**.
9. Przepłukać studzienki zgodnie z instrukcjami w punkcie I.3.
10. Odmierzyć pipetą 100 µL mieszaniny substratu TMB do każdej studzienki, a także do studzienki pustej. Inkubować mikropłytkę w temperaturze pokojowej (18...24°C) przez **15 minut**.

Ważna informacja: Nie wystawiać na działanie silnego bezpośredniego oświetlenia. Ryzyko wygenerowania wysokiego poziomu tła.

11. Odmierzyć pipetą 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję do każdej studzienki, stosując tę samą sekwencję pipetowania co w etapie 10, aby zatrzymać reakcję enzymatyczną. Dodanie roztworu zatrzymującego reakcję zmieni kolor kontroli dodatniej i pozytywnych próbek z niebieskiego na żółty.
12. Zmierzyć intensywność koloru roztworu w każdej studzience, jak opisano w sekcji 1.5, za pomocą filtra 450 nm (odczyt), i możliwie za pomocą filtra 620-630 nm (studzienka pusta) w pozycji A1 na mikropłytkę.

Ważne informacje:

1. Jeśli drugi filtr nie jest dostępny, upewnić się, że na spodzie mikrostudzienki nie widać odcisków palców przed dokonaniem odczytu za pomocą filtra o długości fali 450 nm. Odciski palców mogą generować fałszywe pozytywne wyniki podczas odczytu.
2. Odczyt należy wykonać natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję i zdecydowanie nie później niż 20 minut po jego dodaniu. Nastąpić może również lekkie samoutlenienie substratu, prowadzące do wyższego poziomu tła.

3. Wykazano, że wstrząsanie przy 350 ± 150 obr./min. podczas inkubacji zwiększa czułość testu o około 20%.

N. SCHEMAT TESTU

Jeżeli wyniki badań spełniają wymagania określone powyżej, przejść do następnej sekcji.
Jeśli tak nie jest, nie kontynuować. Należy wykonać następujące kontrole:

Metoda	Czynności (Inkubacja standardowa)	Czynności (Inkubacja krótka)	Problem	Kontrola
Kontrola i kalibrator	200 µL	200 µL	Pusta studzienka > 0,100 OD450nm	1. Czy roztwór substratu nie uległ zanieczyszczeniu podczas oznaczania.
Rozcieńczalnik próbek badanych i próbka	200 µL rozcieńczalnik+ 10 µL próbka	200 µL rozcieńczalnik+ 10 µL próbka	Kontrola ujemna (NC) > 0,050 OD450nm po odjęciu pustej	1. Czy procedura płukania oraz ustawienia płuczki zostały zatwierdzone zgodnie z badaniami wstępnymi. 2. Czy stosowany jest odpowiedni roztwór płuczki i czy płuczka została odpowiednio przygotowana przed użyciem. 3. Czy nie popełniono błędu podczas procedury oznaczania (dozowanie kontroli dodatniej zamiast ujemnej). 4. Czy nie wystąpiło skażenie kontroli negatywnej lub jej studzienek z powodu rozprysków próbek dodatnich lub koniugatu enzymatycznego. 5. Czy mikropipety nie są zanieczyszczone przez próbki dodatnie lub koniugat enzymatyczny. 6. Czy igły płuczki nie są zablokowane lub częściowo zastonięte.
Rozcieńczalnik testowy	50 µL	50 µL		
Pierwsza inkubacja	60 min (± 3)	45 min (± 2)		
Temperatura	+37°C	+37°C		
Płukanie	4-5 cykli	4-5 cykli		
Koniugat enzymatyczny	100 µL	100 µL		
Druga inkubacja	30 min (± 1)	45 min (± 2)		
Temperatura	+37°C	+37°C		
Płukanie	4-5 cykli	4-5 cykli		
Substrat TMB	100 µL	100 µL		
Trzecia inkubacja	30 min (± 1)	15 min (± 1)		
Temperatura	Temperatura otoczenia (18...24°C)	Temperatura otoczenia (18...24°C)		
Roztwór zatrzymujący reakcję	100 µL	100 µL	Kalibrator S/Co < 1,1	1. Czy procedury zostały przeprowadzone prawidłowo. 2. Czy nie popełniono żadnego błędu podczas dozowania (np. dozowanie kontroli ujemnej zamiast kalibratora). 3. Czy procedura płukania oraz ustawienia płuczki zostały zatwierdzone zgodnie z badaniami wstępnymi. 4. Czy nie doszło do skażenia zewnętrznego kalibratora.
Odczyt gęstości optycznej (OD)	450/620 nm	450/620 nm	Kontrola dodatnia <1,000 OD450nm	1. Czy procedury zostały przeprowadzone prawidłowo. 2. Czy nie popełniono błędu podczas dozowania kontroli (dozowanie kontroli ujemnej zamiast dodatniej). W takim przypadku kontrola ujemna wykaże OD450nm > 0,150 3. Czy procedura płukania oraz ustawienia płuczki zostały zatwierdzone zgodnie z badaniami wstępnymi. 4. Czy nie doszło do skażenia zewnętrznego kontroli dodatniej.

Poniżej przedstawiono przykładowy schemat dozowania (dotyczy obu procedur inkubacji):

Mikro płytki												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Objaśnienia: BLK = Pusty NC = Kontrola ujemna
CAL = Kalibrator PC = Kontrola dodatnia S = Próbkę

O. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

W przypadku każdego korzystania z zestawu przeprowadzana jest odpowiednia weryfikacja na kontrolach i kalibratorze w celu sprawdzenia, czy parametry oznaczania są zgodne z wartościami OD450/620nm, a także z oczekiwaniami i wartościami podanymi w poniższej tabeli.

Kontrola	Wymogi
Pusta studzienka	< 0,100 wartość OD450/620nm
Kontrola ujemna (NC)	< 0,050 wartość średnia OD450/620nm po odjęciu pustej
Kalibrator	S/Co > 1,1
Kontrola dodatnia	> 1,000 wartość OD450/620nm

Jeśli wystąpił którykolwiek z powyższych problemów, należy zgłosić problem przełożonemu w celu podjęcia dalszych działań.

P. WYNIKI

Wyniki testu są obliczane na podstawie średniej wartości odcięcia określonej za pomocą następującego wzoru:

$$\text{Wartość odcięcia (Co)} = \text{NC śred.} + 0,350$$

Wartość obliczona dla testu jest używana do interpretacji wyników, jak opisano w następnym akapicie.

Q. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki testu są interpretowane jako stosunek próbki OD450nm i wartości odcięcia (lub S/Co) zgodnie z poniższą tabelą:

S/Co	Interpretacja
< 0,9	Wynik ujemny
0,9 - 1,1	Wynik niejednoznaczny
> 1,1	Wynik dodatni

Wynik ujemny wskazuje, że pacjent nie jest zakażony wirusem HCV lub że jednostka krwi może zostać przetoczona.

Każdy pacjent wykazujący wynik niejednoznaczny powinien zostać ponownie przetestowany na drugiej próbce pobranej 1-2 tygodnie później. Jednostka krwi nie może być przetaczana.

Dodatni wynik wskazuje na zakażenie HCV, dlatego należy odpowiednio leczyć pacjenta lub odrzucić daną jednostkę krwi.

Ważne informacje:

1. Interpretacja wyników powinna odbywać się pod nadzorem kierownika laboratorium w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia błędów w ocenie.
2. Każdy wynik pozytywny powinien zostać potwierdzony z zastosowaniem metody alternatywnej, pozwalającej na wykrycie przeciwciał IgG i IgM (test potwierdzający), przed sformułowaniem diagnozy wirusowego zapalenia wątroby.
3. Jak udowodniono w ocenie wydajności produktu, test jest w stanie wykryć serokonwersję dla rdzeniowych przeciwciał anty HCV wcześniej, niż niektóre inne komercyjne zestawy. Dlatego wynik pozytywny, niepotwierdzony komercyjnymi zestawami, nie może być wykluczony jako wynik fałszywie pozytywny! Próbkę musi zostać poddana testowi potwierdzającemu.
4. Ponieważ test jest w stanie wykryć również przeciwciała IgM, mogą występować rozbieżne wyniki z innymi komercyjnymi produktami do wykrywania przeciwciał anty-HCV bez koniugatu anty-IgM. Rzeczywisty dodatni wynik testu na przeciwciała przeciwko HCV powinien następnie zostać potwierdzony przez badanie reaktywności IgM, istotne dla diagnozy zakażenia wirusem HCV.
5. Gdy wyniki są przesyłane z laboratorium do centrum informatycznego, należy zwrócić uwagę, aby nie przysyłać błędnych danych.
6. Rozpoznanie wirusowego zapalenia wątroby musi być dokonane i przekazane pacjentowi wyłącznie przez wykwalifikowanego lekarza.

Poniżej przedstawiono przykład obliczeń:

Nie używać poniższych danych zamiast rzeczywistych danych uzyskanych przez użytkownika.

Kontrola ujemna: 0,019 – 0,020 – 0,021 OD450nm

Wartość średnia: 0,020 OD450nm Mniejsza niż 0,050 – Zaakceptowana

Kontrola dodatnia: 2,189 OD450nm

Większa niż 1,000 – Zaakceptowana

Wartość odcięcia = 0,020 + 0,350 = 0,370

Kalibrator: 0,550 - 0,530 OD450nm

Wartość średnia: 0,540 OD450nm S/Co = 1,4
S/Co Większa niż 1,1 – Zaakceptowana

Próbka 1: 0,070 OD450nm

Próbka 2: 1,690 OD450nm

Próbka 1 S/Co < 0,9 = ujemna

Próbka 2 S/Co > 1,1 = dodatnia

R. SKUTECZNOŚĆ

Ocena skuteczności została przeprowadzona zgodnie z opisem zamieszczonym we wspólnych specyfikacjach technicznych (CTS) (Artykuł 5, Rozdział 3 Dyrektywy w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in-vitro 98/79/WE) oraz zgodnie z obiema procedurami inkubacji (standardowa i krótka).

1. GRANICA WYKRYWALNOŚCI

Granica wykrywalności testu została obliczona z zastosowaniem krótkiego testu inkubacji i wytycznych normy British Working Standard for anti-HCV, kod NIBSC 06/188-006. Poniższa tabela podaje średnie wartości OD450nm tego standardu po rozcieńczeniu w osoczu ujemnym, a następnie poddanego badaniu.

Rozcieńczenie	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Czynnik	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Osocze ujemne	0,25	0,20	0,20

Ponadto próbka kodowana Accurun 1 – seria 3000 – dostarczona przez Boston Biomedica Inc. (USA) została poddana ocenie w całości. Wyniki zamieszczono poniżej:

Seria	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Accurun 1			
Rozkład na czynniki	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. SWOISTOŚĆ I CZUŁOŚĆ DIAGNOSTYCZNA

Ocena działania urządzenia została przeprowadzona na podstawie próby przeprowadzonej na ponad 5000 próbek.

2.1 Swoistość diagnostyczna

Jest ona definiowana jako prawdopodobieństwo testu do wykazania oceny negatywnej w przypadku braku określonego analitu. Zbadano ogółem 5000 niewyselekcjonowanych dawców, w tym dawców będących dawcami po raz pierwszy.

Swoistość diagnostyczna została oceniona na zestawie zatwierdzonym przez FDA (USA).

Badaniu poddano 5043 dawców. Uzyskano swoistość na poziomie 99,5%.

Badaniu pod kątem HCV poddano 210 hospitalizowanych pacjentów. Uzyskano swoistość na poziomie 99,5%. Ponadto, swoistość diagnostyczną poddano ocenie przez testowanie 162 próbek potencjalnie interferujących (inne choroby zakaźne, pozytywne przeciwciała przeciwko E. coli, pacjenci dotknięci niewirusowymi chorobami wątroby, pacjenci dializowani, kobiety w ciąży, próbki

hemolizowane, próbki lipemiczne itp.). Uzyskano swoistość na poziomie 100%.

Nie zaobserwowano fałszywej reaktywności ze względu na sposób przygotowania próbki. Do określenia wartości swoistości użyto zarówno osocze, otrzymane za pomocą różnych standardowych technik przygotowania (cytrynian, EDTA i heparyna), jak i surowice. Przetestowano również zamrożone próbki w celu sprawdzenia interferencji z powodu zbierania i przechowywania. Nie zaobserwowano interferencji.

2.2 Czułość diagnostyczna

Jest ona definiowana jako prawdopodobieństwo testu do wykazania oceny pozytywnej w obecności określonego analitu. Czułość diagnostyczną poddano ocenie zewnętrznie na łącznej liczbie 348 próbek. Wykryto czułość diagnostyczną na poziomie 100%. Przebadano wewnętrznie ponad 50 innych pozytywnych próbek. Ponownie wykryto czułość diagnostyczną na poziomie 100%.

Badano również pozytywne próbki infekcji generowanych przez różne genotypy HCV.

Ponadto, przebadano większość paneli serokonwersji dostarczonych przez Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) i Zeptometrix, USA, (HCV).

Wyniki dla niektórych z nich podano poniżej.

Panel	Liczba próbek	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Uwaga:

1. Próbki dodatnie
2. HCV v.3.0

Ostatecznie produkt został przetestowany na panelu EFS Ac HCV, nr partii 06.140817, dostarczonym przez Etablissement Francais Du Sang (EFS) (Francja) z następującymi wynikami:

Panel EFS Ac HCV

Próbka	Partia 1 S/Co	Partia 2 S/Co	Partia 3 S/Co	Wyniki oczekiwane
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Ujemna
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Dodatnia
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Dodatnia
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Dodatnia
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Dodatnia
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Dodatnia

3. DOKŁADNOŚĆ

Obliczono ją na pięciu próbkach, jednej ujemnej i czterech dodatnich, które zbadano w czterech powtórzeniach w sześciu oddzielnych seriach.

Wyniki podano poniżej:

Wyniki wewnątrzserijne: Zestaw EIAgen HCV Ab (v.4) – 1. partia (procedura inkubacji krótkiej)

		Dokładność – %CV		
Próbka	Średnia S/Co	Między. seriami	Wewn. serii	Razem
Ujemna	0,03	6,66	10,56	12,48
Dodatnie	1,20	8,52	8,49	12,03
	1,51	7,69	12,22	14,44
	3,57	7,43	11,82	13,97
	11,87	3,42	9,32	9,92

Wyniki wewnątrzserijne: Zestaw EIAgen HCV Ab (v.4) – 1. partia (procedura inkubacji długiej)

		Dokładność – %CV		
Próbka	Średnia S/Co	Między. seriami	Wewn. serii	Razem
Ujemna	0,04	4,67	12,34	13,19
Dodatnie	1,47	9,62	11,40	14,92
	1,82	8,92	12,77	15,58
	4,31	4,59	12,88	13,67
	13,78	2,42	8,96	9,26

Wyniki międzyseryjne: Zestaw EIAgen HCV Ab (v.4) – 1., 2. i 3. partia (procedura inkubacji krótkiej)

	Dokładność – %CV		
Próbka	Partia 1	Partia 2	Partia 3
Ujemna	8,65	8,29	6,13
Kalibrator	4,98	4,44	5,38
Dodatnia	4,11	3,11	1,37

Zmienność przedstawiona w powyższych tabelach nie spowodowała błędnej klasyfikacji próbki.

S. ZALECENIA W ZAKRESIE ROZWIĄZYWANIA PROBLEMÓW

Przestrzeganie procedury i specyfikacji testu, a także właściwe użycie odczynników i właściwe pipetowanie może pomóc w uniknięciu następujących rodzajów błędów:

BŁĄD	MOŻLIWE PRZYCZYNY / ZALECENIA
OD znacznie różniące się ($\pm 50\%$) od podanych w QC	-nieprawidłowa objętość dozowania odczynników (zalecenie: sprawdzić zgodność między objętością ustawioną w pipetach a ilością wymaganą w teście, skalibrować je ponownie) -nieprawidłowa temperatura lub nieprawidłowy czas inkubacji (zalecenie: bardziej skrupulatna konserwacja inkubatora, odnotować początek inkubacji) -błąd w wykonaniu płukania i odczytu fotometrycznego (zalecenie: sprawdzić działanie lub ustawienia odpowiednich przyrządów) -zanieczyszczenie substratu lub koniugatu (zalecenie: używać tylko czystych jednorazowych plastikowych pojemników)
Niski stopień powtarzalności wyników	-niestała objętość dozowania odczynników i próbek (zalecenie: sprawdzić dokładność pipet i zgodność między objętością dozowaną a wymaganą, skalibrować je ponownie) -błąd w wykonaniu płukania lub odczytu fotometrycznego (zalecenie: sprawdzić działanie lub ustawienia odpowiednich przyrządów) -zanieczyszczenie substratu (zalecenie: używać tylko czystych jednorazowych plastikowych pojemników) -zanieczyszczenie lub degradacja odczynników (zalecenie: używać odpowiednich końcówek, czystych jednorazowych plastikowych pojemników i wody destylowanej lub odpowiednika)
Brak reakcji kolorymetrycznej po dodaniu substratu	-nie wykonano dozowania niektórych odczynników -silne zanieczyszczenie koniugatu lub substratu -nieprawidłowe wykonanie procedury oznaczania (np. przypadkowe dozowanie odczynników w niewłaściwej kolejności lub z niewłaściwego pojemnika itp.)
Zbyt niska intensywność reakcji (zbyt niskie OD)	-zbyt krótki czas inkubacji, temperatura inkubacji zbyt niska -nieprawidłowe rozcieńczenie koniugatu
Zbyt wysoka intensywność reakcji (zbyt wysokie OD)	-nieprawidłowe rozcieńczenie koniugatu -zbyt długi czas inkubacji, temperatura inkubacji zbyt wysoka -zła jakość wody do przygotowania roztworu do płukania (niski stopień dejonizacji) -niewystarczające płukanie (nieodpowiednie usunięcie koniugatów)
Nieuzasadnione wyniki	-zanieczyszczenie pipet, końcówek lub pojemników -niestałe i niewystarczające płukanie (nieodpowiednie usunięcie koniugatów)
zbyt wysokie międzyseryjne CV%	-odczynniki i/lub paski nie zostały wstępnie ogrzane do temperatury pokojowej przed użyciem -płuczka do mikropłetek nie płucze prawidłowo (zalecenie: oczyścić głowicę płuczki)

zbyt wysokie wewnątrzseryjne CV%	-niestałe warunki inkubacji (czas, temperatura) -kontrole i próbki nie dozowane w tym samym czasie (w tych samych odstępach czasu) (sprawdzić sekwencję pipetowania) -zmienność wynikająca z pracy operatorów
----------------------------------	---

T. AUTOMATYZACJA

Procedura opisana w niniejszej instrukcji użytkowania dotyczy wyłącznie testów ręcznych. Podczas korzystania z analizatorów automatycznych postępować zgodnie z instrukcjami opisanymi w podręczniku użytkownika danego urządzenia. Każde laboratorium powinno prowadzić rejestr swoich wewnętrznych procesów walidacji wykazujących zgodność z systemami zautomatyzowanymi.

U. OGRANICZENIA

Powtarzalne wyniki fałszywie dodatnie, niepotwierdzone przez weryfikujący rekombinowany test immunoblot (RIBA) lub podobne techniki, zostały ocenione jako występujące w mniej niż 0,1% normalnej populacji. Wykazano, że zamrożone próbki zawierające cząstki lub agregaty fibryny po rozmrożeniu generują wyniki fałszywie dodatnie.

LITERATURA

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, wyd. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turyn, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, wyd. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Waszyngton, DC: US Government Printing Office, 1994; Nr publikacji NIH 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN i in. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH i in. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ i in. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW i in. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB i in. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ i in. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A i in. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK i in. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhood MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human Tlymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK i in. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL i in. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW i in. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ i in. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland i A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre i P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. Artykuł dostępny pod adresem: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. Napisany w ramach konferencji Narodowego Instytutu Zdrowia dot wirusowego zapalenia wątroby typu C w dniach 24-26 marca 1997 roku w Bethesda w stanie Maryland (USA)
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli i E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams i J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada i T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata i T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Citiți cu atenție prezentul prospect, înainte de efectuarea testului și respectați cu strictețe instrucțiunile din cuprinsul acestuia.

Fiabilitatea rezultatelor este garantată numai cu condiția respectării stricte a acestor instrucțiuni.



Producător:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

www.adaltis.net

ro

SIMBOLURI UTILIZATE PE ETICHETE

Română RO							
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro	Număr de catalog	Număr de lot	Atenție, citiți instrucțiunile de utilizare	Limite de temperatură	A se utiliza până la data de	Număr de test
				MICROPLATE	CONTROL+	CONTROL-	CAL
	Producător	A se feri de contactul direct cu razele soarelui	Data fabricației	Microplacă	Control pozitiv	Control negativ	Calibrator
	CONJ	DILSPE	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 20X	DIL AS	RCNS x mL
	Conjugat	Diluant eşantioane	Substrat TMB	Soluție de stopare (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Soluție de spălare tampon concentrată 20x	Diluant pentru probe	Se reconstituie cu x mL
	Risc biologic	Pericol	Atenție				

Atenție:

Soluție de stopare clasificată ca: Skin Corr. 1A



- Avertisment:**
Pericol
- Componente periculoase ce necesită etichetare:**
Acid sulfuric
- Indicații de pericol:**
H314 – Provoacă arsuri grave ale pielii și leziuni oculare grave.
- Recomandări de siguranță:**
P260 Nu inspirați praful/fumul/gazul/aburiivaporii/spray-ul.
P303+P361 +P353 ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau cu părul): scoateți imediat toată îmbrăcămintea contaminată. Clătiți pielea cu apă/faceți un duș.
P305+P351+P338 ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.
P310 Adresați-vă imediat unui CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau unui medic.
P405 A se depozita sub cheie.
P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu legislația în vigoare la nivel local/regional/național/internațional.

Atenție:

Controlul negativ, controlul pozitiv, calibratorul, conjugatul, diluantul pentru eşantioane, diluantul pentru probe și soluție concentrată tampon pentru spălare 20X sunt clasificate ca: Skin Sens. 1



- Avertisment:**
Atenție
- Componente periculoase ce necesită etichetare:**
Amestec de: 5-cloro-2-metil-2H-izotiazolin-3-one [Nr. CE 247-500-7]; 2-metil-2H-izotiazolin-3-one [Nr. CE 220-239-6] (3:1)
- Indicații de pericol:**
H317 Poate provoca o reacție alergică a pielii
- Recomandări de siguranță:**
P261 Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/aburiivaporii/spray-ul.
P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.
P321 Trattamento specific (consultați această etichetă).
P333+P313 În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: adresați-vă medicului.
P302+P352 ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: Spălați cu apă din abundență.
P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu legislația în vigoare la nivel local/regional/național/internațional.

Pentru Fișele cu Date de Securitate, consultați site-ul www.adaltis.net.

A. UTILIZARE

Test imuno-enzimatic (ELISA) de generația a patra, pentru detectarea anticorpilor la virusul hepatitei C, în probe de ser sau plasmă umană (EDTA, Heparină și Citrat). Trusa poate fi utilizată pentru detectarea anticorpilor din unitățile de sânge recoltate de la pacienți infectați cu virusul HCV.

Numai pentru diagnosticarea in vitro.

B. INTRODUCERE

Organizația Mondială a Sănătății (OMS) definește infecția cu virusul hepatitic C ca fiind:

”Hepatita C este o infecție virală a ficatului, denumită, înainte de 1989, până la identificarea agentului cauzator, hepatită ”non A, non B”, cu mecanism de transmitere parenteral. Descoperirea și caracterizarea virusului hepatitic C (HCV) au permis înțelegerea rolului primordial al acestuia în hepatitele post-transfuzionale și a tendinței acestuia de a induce infecții persistente”.

Virusul HCV este una din cauzele majore ale hepatitei acute și a bolilor hepatice cronice, printre care ciroză și cancer la ficat. La nivel global, sunt infectate cu virusul HCV, estimativ, 170 de milioane de persoane, iar între 3 spre 4 milioane de persoane sunt nou infectate în fiecare an. Cele mai frecvente cauze de transmitere a virusului HCV la nivel mondial sunt transfuziile de unități de sânge necontrolate serologic, precum și folosirea, de la o persoană la alta, a acelor și seringilor care nu au fost corect sterilizate. În prezent nu există niciun vaccin disponibil pentru prevenirea hepatitei C, iar tratamentul hepatitelor C cronice este prea costisitor, pentru ca populațiile din țările în curs de dezvoltare să și-l poată permite. Așadar, dintr-o perspectivă globală, cel mai mare impact asupra bolnavilor de hepatită C constă în focalizarea eforturilor asupra reducerii riscurilor de transmitere a virusului HCV pe cale nozocomială (ex.: transfuzii de sânge, injecții nesigure) și asupra reducerii comportamentelor de risc (ex.: injectarea de droguri).

Virusul hepatitei C (HCV) este unul dintre virușii (A, B, C, D și E) ce sunt responsabili de cele mai multe dintre cazurile de hepatită virală. Este un virus ARN încapsulat monocatenar, din familia Flaviviridae, ce are un spectru restrâns de gazde. Oamenii și cimpanzeii reprezintă singurele specii cunoscute ca fiind susceptibile la infecția cu virusul HCV și ambele specii dezvoltă boli similare. O caracteristică importantă a virusului o reprezintă relativa mutabilitate a genomului, legată probabil de o tendință marcată (80%) de a induce infecții cronice. Virusul HCV este reunit în mai multe genotipuri diverse, ce pot fi importante în determinarea gravității bolii și a răspunsului la tratament.

Perioada de incubatie a infecției cu virusul HCV, înainte de manifestarea simptomelor clinice, variază de la 15 la 150 de zile. În infecțiile acute, simptomele cele mai frecvente sunt oboseala și icterul; în orice caz, majoritatea cazurilor (un procent cuprins între 60% și 70%), inclusiv cele ce dezvoltă o infecție cronică, sunt asimptomatice. Aproximativ 80% dintre noii pacienți infectați dezvoltă o infecție cronică. Cirroza apare la un procent cuprins aproximativ între 10% și 20% dintre pacienții cu infecție cronică, în timp ce cancerul hepatic apare la un procent cuprins între 1% și 5% dintre persoanele care prezintă o infecție cronică, pe o perioadă de timp cuprinsă între 20 și 30 de ani. Majoritatea pacienților ce suferă de cancer hepatic fără a

fi infectați cu virusul hepatitei B, prezintă infecție cu virusul HCV. Mecanismul prin care infecția cu virusul HCV cauzează cancerul hepatic nu este încă foarte clar. Hepatita C accentuează gravitatea bolilor ficatului, atunci când se manifestă concomitent cu alte probleme hepatice. Mai precis, bolile ficatului evoluează mai rapid, la persoanele cu boli hepatice cauzate de consumul de alcool și de infecția cu virusul HCV. Virusul HCV se transmite în principal prin contactul direct cu sângele infectat. Transmiterea virusului HCV prin transfuziile de sânge necontrolate serologic în vederea depistării prezenței virusului, folosirea, de la o persoană la alta, a acelor, seringilor și a altor echipamente medicale care nu au fost corespunzător sterilizate, sau schimbul de ace între consumatorii de droguri, este foarte documentată. Transmiterea se poate produce și pe cale sexuală sau perinatală, însă nu la fel de frecvent. Alte modalități de transmitere, ce țin de practici comportamentale, sociale, culturale (body piercing, circumcizii și tatuaje) sunt de asemenea posibile, dacă se utilizează instrumente care nu au fost corespunzător sterilizate. Virusul HCV nu se transmite pe calea strănutului, prin îmbrățișări, tuse, mâncare sau apă, dacă se folosesc aceleași tacâmuri sau pahare, sau prin contact întâmplător.

Atât în țările dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare, grupurile de risc includ consumatorii de droguri injectabile, primitorii de sânge necontrolat serologic, persoanele care suferă de hemofilie, pacienții dializați și persoanele cu numeroși parteneri sexuali, ce practică raporturi sexuale neprotejate. În țările dezvoltate, se estimează că 90% dintre persoanele infectate cu virusul hepatitei C cronice sunt în principal consumatori de droguri injectabile și persoane cărora li s-au administrat transfuzii de sânge necontrolat serologic, sau transfuzii de derivate din sânge. În majoritatea țărilor în curs de dezvoltare, unde se utilizează încă sânge și derivate din sânge neanalizate, principala cale de transmitere a infecției o reprezintă instrumentele pentru injecții nesterilizate și transfuziile de sânge necontrolate serologic. De asemenea, persoanele care practică ritualuri de sacrificare și circumcizii sunt persoane cu risc, dacă folosesc sau re folosesc instrumente metalice nesterilizate.

OMS estimează că aproximativ 170 de milioane de persoane, adică 3% din populația globului, sunt infectate cu virusul HCV și prezintă riscul de a se îmbolnăvi de ciroză și/sau cancer hepatic. Prevalența infecției cu virusul HCV în Africa, Orientul Mijlociu, Asia de Sud-Est și Pacificul de Nord este mult mai mare, față de America de Nord și de Europa.

Testele diagnostice pentru HCV se utilizează pentru a preveni infecțiile prin screening-ul donatorilor de sânge și plasmă, pentru stabilirea diagnosticului clinic și pentru o mai bună luare a deciziilor privind tratamentul administrat unui pacient. Testele diagnostice disponibile în prezent se bazează pe dozări imuno-enzimatice (EIA) pentru detectarea unor anticorpi specifici HCV. Sistemul EIA poate depista peste 95% dintre pacienții cu infecții cronice, dar numai între 50% și 70% dintre infecțiile acute. Analiza RIBA (metoda recombinată de imunoblot) de identificare a anticorpilor care reacționează cu antigene individuale HCV se utilizează adesea ca test suplimentar pentru confirmarea unui rezultat pozitiv obținut prin teste EIA. Teste pentru HCV bazate pe amplificarea acizilor ribonucleici (de ex. PCR, probă cu ADN legat) au fost utilizate atât pentru confirmarea rezultatului serologic, cât și pentru stabilirea eficacității tratamentului antiviral folosit. Un rezultat pozitiv indică prezența infecției active și posibilitatea de extindere a

infecției și/sau de dezvoltare a unor boli cronice ale ficatului.

Medicamentele antivirale, cum ar fi interferonul, administrat ca atare sau împreună cu ribavirina, se pot utiliza pentru tratamentul pacienților cu hepatită C cronică, însă acest tratament este foarte costisitor. Tratamentul ce constă doar în administrarea interferonului este eficient la aproximativ 10-20% dintre pacienți. Interferonul administrat împreună cu ribavirina este eficient la 30-50% dintre pacienți. În schimb, se pare că ribavirina, administrată ca atare, nu este eficientă.

Nu există niciun vaccin eficient împotriva virusului HCV. Cercetările continuă, însă mutabilitatea accentuată a genomului virusului HCV îngreunează descoperirea unui vaccin eficient. De asemenea, și lipsa cunoștințelor privind un eventual răspuns imuno-protector, ulterior infecției cu virusul HCV, încetinește descoperirea vaccinului. Nici măcar nu se știe dacă sistemul imunitar este în stare să elimine virusul.

În orice caz, câteva studii au demonstrat prezența unor anticorpi ce neutralizează virusul, la pacienții infectați cu virusul HCV. În lipsa unui vaccin, trebuie adoptate toate măsurile de precauție pentru a preveni infecția, inclusiv (a) teste screening, testele de sânge și a organelor donate; (b) dezactivarea virusului în plasmă și produse derivate; (c) dezvoltarea și consolidarea practicilor de control al infecției în protocoalele de acțiune sanitară, precum și o corectă sterilizare a instrumentelor medicale și stomatologice; (d) promovarea unor schimbări în relațiile dintre oamenii de rând și operatorii sanitari, pentru a reduce utilizarea excesivă a injecțiilor și pentru practicarea unor injecții sigure; (e) reducerea riscului pentru persoanele consumatoare de droguri și cele ce utilizează practici sexuale de mare risc”.

Genomul codifică pentru componentele structurale, o proteină nucleocapsidică și două glicoproteine de suprafață și componentele funcționale implicate în replicarea virusului și în procesarea proteinelor acestuia. Regiunea de codificare nucleocapsidică pare a fi cea mai conservatoare, dintre probele izolate obținute în întreaga lume.

C. PRINCIPIUL TESTULUI

Microplăcile sunt tapetate cu antigene HCV specifice derivate din regiunile "core" și "ns" de codificare pentru antigenele conservatoare și determinanții antigenici imunodominanți (peptida de bază, NS3 recombinant, peptide NS4 și NS5).

Faza solidă este tratată mai întâi cu eșantionul diluat și, anticorpii HCV, dacă sunt prezenți, se vor lega la antigenele fixate. După etapa de îndepărtare prin spălare a tuturor celorlalte componente ale eșantionului, în cea de-a doua fază de incubare, după legarea anticorpilor HCV, anticorpii IgG și IgM sunt detectați prin adăugarea conjugatului cu anticorpi specifici policlonali anti-IgG&M, marcați cu peroxidază (HRP).

Enzima captată pe faza solidă, reacționând cu amestecul substrat TMB, generează un semnal optic care este proporțional cu cantitatea de anticorpi anti-HCV prezenți în eșantion. O valoare cut-off permite să se interpreteze densitățile optice în rezultate pozitive și negative de anticorpi HCV.

D. COMPONENTE

Trusa conține reactivi pentru 96 de teste (cod 071067), 192 de teste (cod 071064), sau 480 de teste (cod 071068).

Microplacă	1
Control negativ	1x4 mL/fiolă
Control pozitiv	1x2 mL/fiolă
Calibrator	2 fiole
Soluție de spălare tampon concentrată 20x	1x50 mL/fiolă
Conjugat	1x16 mL/fiolă
Diluant pentru eșantioane	1x50 mL/fiolă
Substrat TMB	1x16 mL/fiolă
Soluție de stopare	1x15 mL/fiolă
Diluant pentru probe	1x8 mL/fiolă
Hârtie de sigilare placă	2
Număr de teste	96
Cod	071067

Microplacă	2
Control negativ	2x4 mL/fiole
Control pozitiv	1x4 mL/fiolă
Calibrator	3 fiole
Soluție de spălare tampon concentrată 20x	2x50 mL/fiole
Conjugat	2x16 mL/fiole
Diluant pentru eșantioane	2x50 mL/fiole
Substrat TMB	2x16 mL/fiole
Soluție de stopare	2x15 mL/fiole
Diluant pentru probe	2x8 mL/fiole
Hârtie de sigilare placă	4
Număr de teste	192
Cod	071064

Microplacă	5
Control negativ	1x20 mL/fiolă
Control pozitiv	1x10 mL/fiolă
Calibrator	7 fiole
Soluție de spălare tampon concentrată 20x	5x50 mL/fiole
Conjugat	2x40 mL/fiole
Diluant pentru eșantioane	5x50 mL/fiole
Substrat TMB	2x40 mL/fiole
Soluție de stopare	2x40 mL/fiole
Diluant pentru probe	1x40 mL/fiolă
Hârtie de sigilare placă	10
Număr de teste	480
Cod	071068

1. Microplacă

12 strip-uri de 8 minigodeuri tapetate cu peptidă Core, antigen recombinant NS3, peptide NS4 și NS5. Plăcile sunt sigilate în folie din aluminiu cu absorbant de umezeală.

Așteptați ca microplaca să ajungă la temperatura mediului ambiant (18...24°C) înainte de a deschide folia. Strip-urile nefolosite trebuie reintroduse la loc în folia cu absorbant de umezeală și trebuie păstrate la o temperatură de 2...8°C.

2. Control negativ

Control gata de utilizare. Conține 10 mM soluție tampon citrat de Na cu pH 6.0 ± 0.1, proteină de bază 2% cazeină și conservant 0.1% Proclin 150. Controlul negativ este colorat în culoarea verde măsliniu.

3. Control pozitiv

Control gata de utilizare. Conține proteine din ser de capră în procent de 1%, anticorpi umani pozitivi la virusul

HCV, 10 mM tampon citrat de Na cu pH 6.0 ± 0.1 , 0.5% Tween 20, 0.09% azidă de sodiu și conservant 0.1% Proclin 150. Controlul pozitiv este colorat în culoarea verde închis.

Notă importantă: Lipsa agenților patogeni vitali în soluția de control pozitiv nu poate fi garantată în totalitate, prin urmare reactivul trebuie tratat ca fiind potențial infectat, în conformitate cu principiile de bună practică de laborator.

4. Calibrator

Calibrator liofilizat. Se va dizolva în cantitatea de apă distilată cu aviz EIA indicată pe etichetă. Conține proteine din ser de fetus de vițel, anticorpi umani pozitivi la virusul HCV, cu conținut calibrat după codul NIBSC Working Standard 06/188-006, 10mM de tampon citrat de Na cu pH 6.0 ± 0.1 , 0.3 mg/mL sulfat de gentamicină și conservant 0.1% Proclin 150.

Notă importantă: Lipsa agenților patogeni vitali în calibrator nu poate fi garantată în totalitate, prin urmare reactivul trebuie tratat ca fiind potențial infectat, în conformitate cu principiile de bună practică de laborator.

Note: volumul necesar pentru dizolvarea conținutului fiolei poate varia de la un lot la altul. Vă rugăm să utilizați volumul corespunzător, indicat pe etichetă.

5. Soluție de spălare tamponconcentrată 20x

Soluție concentrată 20X. După diluare, soluția de spălare (tampon de spălare diluat) conține 10 mM tampon fosfat cu pH 7.0 ± 0.2 , 0.05% Tween 20 și 0.05% Proclin 150. După diluare, soluția de spălare rămâne stabilă timp de 1 săptămână, la temperaturi între 2...8°C.

6. Conjugat

Reactiv gata de utilizare, colorat în culoarea roșie. Conține peroxidază de hrean conjugată cu anticorpi policlonali de capră cu IgG și IgM umani, 5% BSA, 10 mM tampon Citrat cu pH 6.4 ± 0.1 și conservanți 0.1% Proclin și 0.05% Tween 20.

7. Substrat TMB

Componentă gata de utilizare. Conține 50 mM soluție tampon citrat-fosfat cu pH 3.5-3.8, 4% dimetil sulfoxid, 0.03% tetrametilbenzidină (TMB) și 0.02% peroxid de hidrogen (H_2O_2). Amestecați ușor, înainte de utilizare.

Notă: A se păstra ferit de lumina directă, deoarece este sensibil la surse de lumină puternice.

8. Diluant pentru probe

Componentă gata de utilizare. Conține ser de capră, 10 mM soluție tris tampon cu pH 8.0 ± 0.1 ce conține 0.1% Proclin 150 și 0.09% azidă de sodiu pentru pre-tratarea eșantioanelor și a soluțiilor de control de pe placă, cu stoparea interferențelor.

9. Soluție de stopare

Componentă gata de utilizare.

Conține o soluție 0.3 M de H_2SO_4 . Amestecați ușor, înainte de utilizare.

10. Diluant eșantion

Componentă gata de utilizare, colorată în culoarea verde închis. Conține 1% cazeină, 10 mM tampon citrat de Na cu pH 6.0 ± 0.1 și conservant 0.1% Proclin 150.

A se utiliza pentru diluarea eșantionului.

Notă: Diluantul își schimbă culoarea din verde măsliniu, în verde închis-albastru, în prezența eșantionului.

E. MATERIALE NECESARE, DAR NEINCLUSE ÎN TRUSĂ

1. Micropipete calibrate (200 μ L și 10 μ L) și vârfuri de unică folosință.
2. Apă distilată cu aviz EIA (bidistilată sau deionizată, tratată cu cărbune activ pentru îndepărtarea oxidanților chimici folosiți ca dezinfectanți).
3. Cronometru cu interval de timp de 60 minute sau mai mult.
4. foi de hârtie absorbantă.
5. Incubator termostatic calibrat pentru microplăci ELISA, ce poate asigura o temperatură de +37°C.
6. Cititor calibrat de microplăci ELISA, cu capacitate de citire la 450 nm, prevăzut dacă este posibil cu filtre de 620-630 nm pentru detectarea blank-ului.
7. Spălător calibrat pentru microplăci ELISA.
8. Mixer vortex sau alte dispozitive asemănătoare pentru centrifugare.

F. AVERTISMENTE ȘI PRECAUȚII

1. Această trusă poate fi utilizată doar de personal tehnic specializat și corespunzător calificat, sub supravegherea medicului șef de laborator. Citiți cu atenție prezentul prospect, înainte de dozare și respectați cu strictețe instrucțiunile din cuprinsul acestuia.
2. Citiți cu atenție Fișa cu Date de Securitate (SDS), înainte de a efectua dozarea.
3. În cazul utilizării trusei pentru screening-ul unor unități de sânge și componente ale sângelui, acesta va trebui să fie utilizată într-un laborator certificat și autorizat de autoritatea națională responsabilă în domeniu (Ministerul Sănătății sau un organism similar), în vederea efectuării acestui tip de analize.
4. Întreg personalul implicat în executarea probei trebuie să fie echipat cu îmbrăcăminte de protecție de laborator, mănuși din latex fără talc și ochelari de protecție. Utilizarea oricăror dispozitive ascuțite (ace) sau tăioase (lame) este interzisă. Întreg personalul implicat trebuie să fie instruit cu privire la procedurile de siguranță personală, conform recomandărilor Centrului pentru Controlul Bolilor Atlanta, SUA, indicate în publicația Autorității Naționale pentru Sănătate: "Siguranță personală în Laboratoarele de Microbiologie și Biomedicină", ediția 1984.
5. Întreg personalul implicat în manipularea eșantioanelor trebuie să fie vaccinat împotriva virusurilor HBV și HAV, pentru care există vaccinuri sigure și eficiente.
6. Încăperea laboratorului trebuie să aibă un mediu controlat, pentru a se evita contaminarea cu praf sau cu agenți microbiologici din aer, în momentul deschiderii fiolelor și al microplăcii din trusă și în momentul efectuării testului. Substrat (TMB) trebuie ferit de lumina puternică. După începerea testului, evitați vibrațiile mesei de lucru.
7. După recepționarea trusei, aceasta trebuie păstrată la o temperatură de 2...8°C, într-un frigider sau într-o cameră rece, cu temperatură controlată.
8. Nu folosiți componente din truse aparținând unor loturi diferite. Nu se recomandă folosirea componentelor din două truse aparținând aceluiași lot.
9. Asigurați-vă că reactivii sunt limpezi și că nu conțin microorganisme sau particule de mari dimensiuni. Dacă reactivii nu îndeplinesc aceste condiții, anunțați

imediat responsabilul de laborator, pentru a demara procedurile necesare în vederea schimbării trusei.

10. Evitați contaminările încrucișate între eșantioane de ser/plasmă, folosind vârfuri de unică folosință, pe care să le înlocuiți la fiecare eșantion.
11. Evitați contaminările încrucișate între reactivii din trusă, folosind vârfuri de unică folosință pe care să le înlocuiți la fiecare componentă în parte.
12. Nu folosiți trusa după expirarea termenului de valabilitate a acesteia, tipărit pe cutie și pe eticheta aplicată pe fiecare fiolă în parte.
13. Toate eșantioanele trebuie considerate ca fiind potențial infectate. Toate serurile umane trebuie manipulate conform prevederilor Nivelului 2 de Bio-Siguranță, urmând recomandările Centrului pentru Controlul Bolilor Atlanta, SUA, precum și cele din cuprinsul publicației Autorității Naționale pentru Sănătate: "Bio-Siguranță în Laboratoarele de Microbiologie și Biomedicină", ediția 1984.
14. Pentru prepararea componentelor lichide, sau pentru componentele mutate pe stațiile de testare automatizate, se recomandă folosirea de recipiente din plastic de unică folosință, în felul acesta evitându-se contaminările încrucișate.
15. Deșeurile rezultate în urma folosirii trusei se vor elimina conform prevederilor legislației în vigoare la nivel național și ale legislației în materie de deșuri rezultate din substanțe chimice și biologice de laborator. Mai precis, scurgerile de lichide, rezultate în urma procedurii de spălare, resturile de soluții de control și resturile de soluții eșantion trebuie considerate ca fiind potențial infectate și trebuie supuse procedurii de inactivare, înainte de a fi eliminate. Se recomandă procedura de inactivare prin tratarea cu o soluție de hipoclorit de sodiu cu concentrație de 10% timp de 16-18 ore sau dezactivarea la cald, în autoclavă, la 121°C timp de 20 minute.
16. Scurgerile accidentale de soluții eșantion, în timpul efectuării testelor, trebuie absorbite cu foi de hârtie înmuiate în hipoclorit de sodiu, iar apoi trebuie clătite cu apă. Ulterior, respectivele foi de hârtie se vor arunca într-un recipient special pentru deșuri provenite din materiale biologice.
17. Soluția de stopare conține 0,3 M acid sulfuric. Evitați contactul acesteia cu pielea și ochii. În caz de contact, clătiți imediat și abundant cu apă.
18. Eliminarea soluțiilor reactive ce conțin azidă de sodiu sau thimerosal, drept conservanți, trebuie tratate conform prevederilor și legislației în vigoare în materie, în țara în care se utilizează testul. Eliminarea soluțiilor ce conțin azidă de sodiu prevede utilizarea unor mari cantități de apă de la robinet. Rețineți faptul că azida de sodiu poate forma compuși explozivi, în urma contactului prelungit cu plumbul sau cuprul.
19. Nu fumați, nu mâncați și nu aplicați produse cosmetice în zonele în care sunt manipulate eșantioanele și reactivii.
20. Celelalte deșuri produse în urma utilizării trusei (de exemplu: vârfurile folosite pentru controale și eșantioane, microplăcile folosite) trebuie să fie manipulate ca și cum ar fi potențial infectate și trebuie colectate conform prevederilor legislației în vigoare la nivel național și ale legislației privind eliminarea deșeurilor de laborator.
21. Nu pipetați substanțele cu gura.

G. EȘANTIOANE: PREPARARE ȘI RECOMANDĂRI

1. Sângele se recoltează din venă prin metode aseptice, iar plasmă și serurile se prepară prin folosirea tehnicilor standard de preparare a eșantioanelor pentru analize clinice de laborator. Nu s-a depistat nicio influență, în cazul preparării eșantionului cu citrat, EDTA sau heparină.
2. Nu adăugați niciun fel de conservanți în eșantioane; evitați mai ales azida de sodiu, deoarece aceasta poate influența activitatea enzimatică a conjugatului, determinând obținerea unor rezultate fals negative.
3. Eșantioanele trebuie să fie clar identificate cu coduri sau nume, pentru a se evita confuziile în interpretarea rezultatelor. În cazul în care trusa se utilizează pentru teste screening ale unor unități de sânge, recomandăm insistent etichetarea acestora cu coduri de bare ce se vor citi cu un cititor electronic.
4. Eșantioanele intens hemolizate (roșii) sau lipemice (lăptoase) trebuie aruncate, deoarece pot duce la obținerea unor rezultate false. Eșantioanele ce conțin resturi de fibrină sau cheaguri și corpuri microbiologice trebuie aruncate, deoarece pot duce la obținerea unor rezultate false.
5. Serurile și plasmă se vor păstra la temperaturi de +2...+8°C cel mult cinci zile după recoltare. Pentru conservarea acestora pe perioade mai îndelungate de timp, eșantioanele pot fi congelate la -20°C timp de câteva luni. Niciun eșantion congelat nu poate fi congelat și decongelat decât o singură dată, deoarece acest proces generează particule ce pot compromite rezultatul testului.
6. În cazul în care eșantionul conține particule, centrifugați la o viteză de 2.000 rpm timp de 20 minute, sau filtrați cu filtre de 0.2-0.8μm pentru a curăța eșantionul ce trebuie testat.

H. PREPARAREA COMPONENTELOR ȘI AVERTISMENTE

Studiile efectuate pe o trusă deschisă nu au demonstrat nicio pierdere semnificativă de activitate la cel mult 1 reutilizare a aceluiași material, în termen de 6 luni.

1. Microplăci:

Așteptați până când microplaca ajunge la temperatura mediului ambiant (cel puțin 1 oră) înainte de a deschide folia. Verificați dacă absorbantul de umezeală nu și-a schimbat culoarea în verde închis, ceea ce ar indica o conservare deficitară a trusei. În astfel de situații, adresați-vă serviciului clienți din cadrul firmei Adaltis. Strip-urile nefolosite trebuie introduse la loc în folie, cu tot cu absorbantul de umezeală. Folia se va sigila perfect și se va păstra la temperaturi de 2...+8°C. După prima deschidere, strip-urile rămase vor fi stabile până când indicatorul de umezeală din interiorul foliei cu absorbant de umezeală își va schimba culoarea din galben în verde.

2. Control negativ:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

3. Control pozitiv:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare. Această componentă trebuie tratată ca și cum ar fi potențial infectată.

4. Calibrator:

Dizolvați cu atenție conținutul liofilizat al fiolei cu cantitatea de apă distilată cu aviz EIA, indicată pe etichetă. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

Această componentă trebuie tratată ca și cum ar fi potențial infectată.

Notă: După dizolvare, calibratorul nu este stabil. Păstrați în părți egale, la temperaturi de -20°C .

5. Soluție de spălare concentrată 20x

(flacon de 50 mL):

Întreaga cantitate de soluție concentrată 20x se va dizolva cu apă biodistilată, până la 1000 ml (volumul este indicat pe etichetă) și se va amesteca ușor, înainte de utilizare. Deoarece soluția poate să conțină formațiuni cristaline, aveți grijă să dizolvați întreaga cantitate. În timpul preparării, evitați producerea spumei, deoarece prezența bulelor poate compromite eficiența fazei de spălare.

Notă: După diluare, soluția de spălare rămâne stabilă timp de 1 săptămână, la $+2..8^{\circ}\text{C}$.

6. Conjugat:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare. Aveți grijă să nu contaminați lichidul cu oxidanți chimici, pulberi sau microbi prezenți în aer. Dacă este necesară mutarea acestei componente, folosiți exclusiv recipiente din plastic, pe cât posibil sterilizate.

7. Substrat TMB:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare. Aveți grijă să nu contaminați lichidul cu oxidanți chimici, pulberi sau microbi prezenți în aer. A se feri de lumină puternică, agenți oxidanți și suprafețe metalice. Dacă este necesară mutarea acestei componente, folosiți exclusiv recipiente din plastic, pe cât posibil sterilizate.

8. Diluant pentru probă:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

9. Soluție de stopare:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

10. Diluant pentru eșantion:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

I. INSTRUMENTAR UTILIZAT ÎMPREUNĂ CU TRUSA

1. Micropipetele trebuie să fie gradate, pentru a picura cantitatea corectă necesară pentru probă și este obligatorie o decontaminare regulată (cu spirt medicinal, înălbitor 10%, soluție dezinfectantă de uz spitalicesc) a acelor componente care pot intra accidental în contact cu eșantionul. Acestea trebuie să fie în permanență controlate, pentru a se asigura o precizie de 1% și o corectitudine de $\pm 2\%$. La intervale regulate de timp, este obligatorie o dezinfectare a stropilor sau reziduurilor de componente din set.
2. Incubatorul ELISA trebuie să fie setat la 37°C (cu o toleranță de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) și trebuie să fie verificat cu regularitate, pentru a se asigura menținerea unei temperaturi corecte. Pentru incubare se pot utiliza atât incubatoarele pe uscat, cât și băile de apă, dacă dispozitivele sunt omologate pentru incubarea testelor ELISA.

3. Spălătorul ELISA este extrem de important pentru efectuarea cu succes a probei. Spălătorul trebuie să fie omologat și trebuie să fie corect optimizat. De regulă, sunt suficiente 4-5 cicluri de spălare (aspirare + distribuire a unei cantități de 350 μL de soluție de spălare = 1 ciclu) pentru ca proba să permită obținerea unui rezultat corect. Se recomandă un interval de timp de înmuiere de 20-30 secunde, între cicluri. Pentru a stabili corect numărul acestora, se recomandă să se efectueze un test de probă cu soluțiile de control din trusă și cu eșantioane de referință clar stabilite ca fiind pozitive sau negative și să se verifice conformitatea cu valorile indicate mai jos, în secțiunea O "Control de calitate intern". Operațiunile de gradare corectă a volumului distribuit și de întreținere a spălătorului (decontaminare și curățare a acelor) se vor efectua conform instrucțiunilor producătorului.
4. Timpii de incubare au o toleranță de $\pm 5\%$.
 - ✓ Metodă de incubare de scurtă durată (pentru prima/a 2-a incubare, toleranța este cuprinsă între 43 min. și 47 min.; pentru cea de-a 3-a incubare, toleranța este cuprinsă între 14 și 16 min.).
 - ✓ Metodă de incubare standard (pentru prima incubare, toleranța este cuprinsă între 57 min. și 63 min.; pentru cea de-a 2-a și cea de-a 3-a incubare, toleranța este cuprinsă între 29 și 31 min.).
5. Cititorul de microplăci ELISA trebuie să fie prevăzut cu un filtru de citire la 450nm și, pe cât posibil, și cu un al doilea filtru (620-630nm) pentru operațiunile de blank. Performanțele sale standard trebuie să fie (a) amplitudine de bandă $\leq 10\text{nm}$; (b) interval de absorbție de la 0 la ≥ 2.0 ; (c) liniaritate ≥ 2.0 ; (d) repetabilitate $\geq 1\%$. Blank-ul este determinat în godeul descris în secțiunea "Procedură de efectuare a probei". Sistemul optic al cititorului trebuie să fie corect etalonat, pentru a asigura o măsurare corectă a densității optice. Efectuați cu regularitate operațiunile de întreținere, conform instrucțiunilor producătorului.
6. Atunci când se utilizează o stație automată pentru truse ELISA, toate etapele critice (distribuie, incubare, spălare, citire, manipulare a datelor) trebuie să fie atent verificate, etalonate și corect desfășurate, în vederea menținerii conformității cu valorile indicate în secțiunile O "Control de calitate intern". Protocolul probei trebuie să fie instalat în sistemul de operare al unității și trebuie să fie validat și pentru spălător și cititor. De asemenea, partea stației ce realizează manipularea componentelor lichide (distribuie și spălare) trebuie să fie validată și corect setată. O atenție deosebită se va acorda evitării transferului prin intermediul acelor utilizate pentru distribuie și spălare. Acesta trebuie să fie studiat și controlat, în vederea minimizării pericolului de contaminare a godeurilor alăturate. Utilizarea unor stații automate ELISA este recomandată pentru testele screening de sânge, atunci când numărul de eșantioane ce trebuie testate este de peste 20-30 unități pe tură.

L. CONTROALE ȘI OPERAȚIUNI PREMERGĂTOARE PROBEI

1. Verificați termenul de valabilitate al trusei, tipărit pe eticheta aplicată pe cutie. Nu folosiți trusa, dacă termenul de valabilitate este expirat.
2. Verificați componentele lichide, acestea nu trebuie să fie contaminate cu particule sau microorganisme vizibile cu ochiul liber. Asigurați-vă că substratul TMB este incolor sau de culoarea bleu pal, aspirând o cantitate mică din acesta cu o pipetă sterilă din plastic transparent. Verificați dacă ambalajul nu s-a rupt în timpul transportului și dacă nu s-au produs scurgeri de lichide în interiorul cutiei. Verificați ca folia de aluminiu, în care se află microplaca, să nu fie găurită sau deteriorată.
3. Diluați întreg conținutul soluției concentrate de spălare 20x, conform instrucțiunilor de mai sus.
4. Dizolvați calibratorul, conform instrucțiunilor de mai sus.
5. Așteptați până când toate componentele trusei ajung la temperatura camerei (aproximativ 1 oră) și apoi amestecați conform instrucțiunilor.
6. Setări incubatorul ELISA la +37°C și pregătiți spălătorul ELISA amorsându-l cu soluția de spălare diluată, conform instrucțiunilor producătorului. Setări numărul corect de cicluri de spălare, conform instrucțiunilor din secțiunea I.3.
7. Asigurați-vă că cititorul ELISA este pornit de cel puțin 20 de minute, înainte de a efectua citirea.
8. Dacă se utilizează o stație automată, porniți stația, verificați setările acesteia și asigurați-vă că utilizați protocolul corect.
9. Controlați dacă micropipetele au fost setate la volumul prevăzut.
10. Asigurați-vă că aveți la îndemână toate instrumentele necesare, gata de a fi utilizate.
11. În cazul sesizării unor probleme, nu continuați derularea testului, ci informați persoana responsabilă.

M. PROCEDURĂ DE EFECTUARE A PROBEI

Proba trebuie efectuată conform instrucțiunilor de de mai jos, având grijă să se păstreze aceeași incubare, pentru toate eșantioanele ce trebuie testate.

Proba se poate efectua prin două proceduri de incubare. Alegeți-o pe cea mai potrivită, conform regulamentelor în vigoare:

1. Incubare standard (prima incubare 60 minute, a 2-a și a 3-a incubare 30 minute)
2. Incubare de scurtă durată (prima și a 2-a incubare 45 minute, a 3-a incubare 15 minute)

1. Incubare standard - Probă manuală:

1. Introduceți numărul corect de godeuri în suportul respectiv. Lăsați primul godeu gol, pentru blank.
2. Adăugați 200 µL de control negativ în trei godeuri, 200 µL de calibrator în două și 200 µL de control pozitiv într-un singur godeu. Nu diluați controalele și calibratorul, deoarece sunt deja diluate și gata de utilizare!
3. Adăugați 200 µL de diluant pentru eșantioane în toate godeurile eșantioanelor; adăugați apoi 10 µL de eșantion în fiecare godeu corespunzător identificat. Agitați ușor placa, având grijă să evitați revărsarea și contaminarea godeurilor alăturate, pentru a dizolva complet eșantionul în diluantul acestuia.

Notă importantă: Asigurați-vă că diluantul pentru eșantion, după adăugarea eșantionului, își schimbă culoarea din verde deschis în verde-albastru închis, pentru a semnaliza adăugarea eșantionului.

4. Adăugați 50 µL de diluant pentru probă în toate godeurile cu soluții de control/calibrator și cu eșantioane. Verificați dacă eșantioanele își schimbă culoarea în albastru închis.
5. Incubați microplaca timp de **60 min la +37°C**.
Notă importantă: Strip-urile trebuie să fie sigilate cu hârtia adezivă specială din dotare, numai atunci când testul este efectuat manual. Nu acoperiți strip-urile, dacă se folosește un dispozitiv ELISA automat.
6. Spălați microplaca într-un spălător automat, distribuind și aspirând 350 µL/godeu de soluție de spălare diluată conform instrucțiunilor din secțiunea I.3.
7. Pipetați 100 µL de conjugat enzimatic în toate godeurile, cu excepția celui pentru blank și apoi sigilați cu hârtie adezivă. Asigurați-vă că ați adăugat această componentă de culoare roșie în toate godeurile, cu excepția A1.

Notă importantă: Aveți grijă să nu loviți peretele intern din plastic al godeului, cu vârful plin cu conjugat. Se pot produce contaminări.

8. Incubați microplaca timp de **30 min la +37°C**.
9. Spălați godeurile, urmând instrucțiunile din secțiunea I.3.
10. Pipetați 100 µL de amestec substrat TMB în fiecare godeu, inclusiv în cel pentru Blank. Incubați microplaca **la temperatura mediului ambiant (18-24°C) timp de 30 minute**.

Notă importantă: Amestecul trebuie ferit de lumina directă puternică. Lumina puternică poate genera fundaluri accentuate.

11. Pipetați 100 µL de soluție de stopare în fiecare godeu, folosind aceeași ordine de pipetare descrisă la punctul 10, pentru a bloca reacția enzimatică. La adăugarea soluției de stopare, controlul pozitiv și eșantioanele pozitive își vor schimba culoarea, din albastru în galben.
12. Măsurați intensitatea culorii soluției din fiecare godeu, conform instrucțiunilor din secțiunea 1.5, cu un filtru de citire optică la 450 nm și dacă este posibil cu un filtru de citire optică la 620-630 nm pentru blank-ul din godeul A1 de pe microplacă.

Note importante:

1. Dacă nu aveți la dispoziție cel de-al doilea filtru de citire optică, asigurați-vă că nu există amprente digitale pe fundalul microplăcii, înainte de citirea optică la 450 nm. Astfel de amprente pot determina obținerea unor rezultate fals pozitive.
2. Citirea optică trebuie efectuată imediat după adăugarea soluției de stopare și, în orice caz, în maxim 20 de minute de la adăugarea acesteia. Este posibil să apară o ușoară auto-oxidare a substratului, cu generarea unui rezultat cu fundal accentuat.
3. Centrifugarea la 350 ± 150 rpm în timpul incubării determină o creștere a sensibilității de dozare, cu circa 20%.

2. Incubare de scurtă durată - Probă manuală:

1. Introduceți numărul corect de godeuri în suportul respectiv. Lăsați primul godeu gol, pentru blank.
2. Adăugați 200 µL de control negativ în trei godeuri, 200 µL de calibrator în două și 200 µL de control pozitiv într-un singur godeu. Nu diluați controalele și calibratorul, deoarece sunt deja diluate și gata de utilizare!
3. Adăugați 200 µL de diluant pentru eșantioane în toate godeurile eșantioanelor; adăugați apoi 10 µL de eșantion în fiecare godeu corespunzător identificat. Agitați ușor placa, având grijă să evitați revărsarea și contaminarea godeurilor alăturate, pentru a dizolva complet eșantionul în diluantul acestuia.

Notă importantă: Asigurați-vă că diluantul pentru eșantion, după adăugarea eșantionului, își schimbă culoarea din verde deschis în verde-albastru închis, pentru a semnaliza adăugarea eșantionului.

4. Adăugați 50 µL de diluant pentru probă în toate godeurile cu soluții de control/calibrator și cu eșantioane. Verificați dacă eșantioanele își schimbă culoarea în albastru închis.
5. Incubați microplaca timp de **45 min la +37°C**.
Notă importantă: Strip-urile trebuie să fie sigilate cu hârtia adezivă specială din dotare, numai atunci când testul este efectuat manual. Nu acoperiți strip-urile, dacă se folosește un dispozitiv ELISA automat.
6. Spălați microplacă într-un spălător automat, distribuind și aspirând 350 µL/godeu de soluție de spălare diluată conform instrucțiunilor din secțiunea I.3.
7. Pipetați 100 µL de conjugat enzimatic în toate godeurile, cu excepția celui pentru blank și apoi sigilați cu hârtie adezivă. Asigurați-vă că ați adăugat această componentă de culoare roșie în toate godeurile, cu excepția A1.

Notă importantă: Aveți grijă să nu loviți peretele intern din plastic al godeului, cu vârful plin cu conjugat. Se pot produce contaminări.

8. Incubați microplacă timp de **45 min la +37°C**.
9. Spălați godeurile, urmând instrucțiunile din secțiunea I.3.
10. Pipetați 100 µL de amestec substrat TMB în fiecare godeu, inclusiv în cel pentru Blank. Incubați microplacă la temperatura mediului ambiant (18-24°C) timp de **15 minute**.

Notă importantă: Amestecul trebuie ferit de lumina directă puternică. Lumina puternică poate genera fundaluri accentuate.

11. Pipetați 100 µL de soluție de stopare în fiecare godeu, folosind aceeași ordine de pipetare descrisă la punctul 10, pentru a bloca reacția enzimatică. La adăugarea soluției de stopare, controlul pozitiv și eșantioanele pozitive își vor schimba culoarea, din albastru în galben.
12. Măsurați intensitatea culorii soluției din fiecare godeu, conform instrucțiunilor din secțiunea 1.5, cu un filtru de citire optică la 450 nm și dacă este posibil cu un filtru de citire optică la 620-630 nm pentru blank-ul din godeul A1 de pe microplacă.

Note importante:

1. Dacă nu aveți la dispoziție cel de-al doilea filtru de citire optică, asigurați-vă că nu există amprente

digitale pe fundalul microplăcii, înainte de citirea optică la 450 nm. Astfel de amprente pot determina obținerea unor rezultate fals pozitive.

2. Citirea optică trebuie efectuată imediat după adăugarea soluției de stopare și, în orice caz, în maxim 20 de minute de la adăugarea acesteia. Este posibil să apară o ușoară auto-oxidare a substratului, cu generarea unui rezultat cu fundal accentuat.
3. Centrifugarea la 350 ± 150 rpm în timpul incubării determină o creștere a sensibilității de dozare, cu circa 20%.

N. SCHEMĂ PROBĂ

Metodă	Operațiuni (Incubare Standard)	Operațiuni (Incubare de scurtă durată)
Soluții de control & Calibrator	200 µL	200 µL
Diluant pentru eșantioane și Eșantion	200 µL diluant+ 10 µL eșantion	200 µL diluant+ 10 µL eșantion
Diluant pentru probe	50 µL	50 µL
Prima incubare	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatură	+37°C	+37°C
Spălare	4-5 cicluri	4-5 cicluri
Conjugat enzimatic	100 µL	100 µL
A 2-a incubare	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatură	+37°C	+37°C
Spălare	4-5 cicluri	4-5 cicluri
Substrat TMB	100 µL	100 µL
A 3-a incubare	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatură	Temperatură mediu ambiant (18...24°C)	Temperatură mediu ambiant (18...24°C)
Soluție de stopare	100 µL	100 µL
Citire DO	450/620nm	450/620nm

Mai jos vă prezentăm un exemplu de schemă de distribuție (valabil pentru ambele proceduri de incubare):

Microplacă

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	E2										
B	CN	E3										
C	CN	E4										
D	CN	E5										
E	CAL	E6										
F	CAL	E7										
G	CP	E8										
H	E1	S9										

Legendă: BLK = Blank CN = Control Negativ
CAL = Calibrator CP = Control Pozitiv E = Eșantion

O. CONTROL DE CALITATE INTERN

Se va efectua un control de validare asupra soluțiilor de control și calibratorului, ori de câte ori se utilizează trusa, pentru a se verifica dacă performanțele probei sunt în conformitate atât cu valorile de DO 450/620nm, cât și cu valorile așteptate, indicate în tabelul de mai jos:

Verificați	Cerințe
Godeu blank	< 0.100 DO 450/620nm valoare
Control negativ (CN)	< 0.050 valoare medie DO450/620nm după extragerea blank-ului
Calibrator	S/Co >1.1
Control pozitiv	>1.000 DO450/620nm valoare

Dacă rezultatele testului corespund cerințelor de mai sus, treceți la secțiunea următoare.

În caz contrar, nu treceți mai departe și efectuați următoarele verificări:

Probleme	Verificați
Godeu blank > 0.100 DO450nm	1. dacă soluția substrat nu s-a contaminat în timpul probei
Control Negativ (CN) > 0.050 DO450nm după extragerea blank-ului	1. dacă procedura de spălare și setările spălătorului au fost setate conform studiilor de precalificare; 2. dacă s-a utilizat soluția corectă de spălare și dacă spălătorul a fost amorsat înainte de utilizare; 3. dacă nu s-a comis vreo eroare în procedura de efectuare a probei (adăugarea de soluție de control pozitiv, în locul celei de control negativ); 4. dacă nu s-a produs vreo contaminare a soluției de control negativ sau a godeurilor acestuia, din cauza unor stropi de soluție de control pozitiv sau de conjugat enzimatic; 5. dacă micropipetele nu s-au contaminat cu eșantioane pozitive sau cu conjugat enzimatic; 6. dacă acele spălătorului nu sunt blocate sau parțial înfundate.
Calibrator S/Co < 1.1	1. dacă procedurile au fost executate corect; 2. dacă nu a apărut nicio eroare în timpul adăugării acestuia (de ex. adăugarea de soluție de control negativ în locul calibratorului); 3. dacă procedura de spălare și setările spălătorului au fost setate conform studiilor de precalificare; 4. dacă nu s-a produs nicio contaminare externă a calibratorului.
Control pozitiv <1.000 DO450nm	1. dacă procedurile au fost executate corect; 2. dacă nu s-a comis nicio eroare în timpul adăugării controlului (adăugare de soluție de control negativ, în locul controlului pozitiv). În astfel de situații, controlul negativ va indica o DO 450nm > 0.150 3. dacă procedura de spălare și setările spălătorului au fost setate conform studiilor de precalificare; 4. dacă nu s-a produs nicio contaminare externă a controlului pozitiv

În cazul în care a apărut una dintre problemele de mai sus, anunțați responsabilul, pentru a se decide modul de acțiune.

P. REZULTATE

Rezultatele testului sunt calculate pe baza unei valori medii de cut-off stabilită cu ajutorul formulei de mai jos:

Cut-Off (Co) = valoare absorbantă medie CN (control negativ) + 0.350

Valoarea determinată pentru test se va utiliza pentru interpretarea rezultatelor, conform instrucțiunilor din paragraful următor.

Q. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele testului se vor interpreta ca raport dintre valoarea DO 450 nm a eșantionului și valoarea Cutt-off (sau S/Co), pe baza următorului tabel:

S/Co	Interpretare
< 0.9	Negativ
0.9 - 1.1	Invalid
> 1.1	Pozitiv

Un rezultat negativ indică faptul că pacientul nu este infectat cu virusul HCV, sau că unitatea de sânge poate fi utilizată pentru transfuzie.

Pentru pacienții în cazul cărora rezultatul testului este invalid, va fi necesară repetarea testului, cu un eșantion prelevat după 1-2 săptămâni. Unitatea de sânge nu va putea fi utilizată pentru transfuzie.

Un rezultat pozitiv indică prezența infecției cu virusul HCV, prin urmare pacientul trebuie să fie supus tratamentului aferent, iar unitatea de sânge trebuie distrusă.

Note importante:

1. Interpretarea rezultatelor se va face exclusiv sub supravegherea șefului de laborator, pentru a se reduce riscul unor erori de analiză.
2. Orice rezultat pozitiv trebuie să fie confirmat printr-o metodă alternativă, în măsură să detecteze anticorpii IgG și IgM (teste de confirmare), înainte de pronunțarea unui diagnostic de hepatită virală.
3. După cum am indicat în evaluarea performanțelor produsului, această analiză este în măsură să detecteze seroconversia la anticorpi anti-HCV core, înaintea unor alte truse din comerț. Așadar, un rezultat pozitiv, neconfirmat, obținut cu aceste truse din comerț, nu trebuie să fie exclus, ca rezultat fals pozitiv! În orice caz, eșantionul trebuie supus și unui test de confirmare.
4. Din moment ce proba este în măsură să determine și anticorpii de clasă IgM, este posibil să apară neconcordanțe cu alte produse din comerț, pentru detectarea anticorpilor anti-HCV, ce nu conțin conjugat anti IgM. Pozitivitatea reală a eșantionului pentru anticorpii HCV trebuie să fie confirmată ulterior, examinându-se și reactivitatea IgM, importantă pentru diagnosticarea infecției cu virusul HCV.
5. Atunci când rezultatele sunt transmise de la laborator către un sistem electronic, aveți grijă să nu transmiteți date greșite.
6. Diagnosticul de hepatită virală trebuie să fie stabilit și comunicat pacientului doar de personal medical calificat.

În continuare vă prezentăm un exemplu de calcul:

Datele de mai jos nu trebuie folosite în locul datelor reale, obținute de către utilizator.

Control negativ: 0.019 – 0.020 – 0.021 DO450nm

Valoare medie: 0.020 DO450nm Mai mică de 0.050 – Acceptat

Control pozitiv: 2.189 DO450nm

Peste 1.000 – Acceptat

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370
 Calibrator: 0.550 - 0.530 DO450nm
 Valoare medie: 0.540 DO450nm S/Co = 1.4
 S/Co peste 1.1 – Acceptat

Eșantion 1: 0.070 DO450nm
 Eșantion 2: 1.690 DO450nm
 Eșantion 1 S/Co < 0.9 = negativ
 Eșantion 2 S/Co > 1.1 = pozitiv

R. PERFORMANȚELE TESTULUI

Evaluarea performanțelor testului s-a realizat conform prevederilor Specificațiilor Tehnice Comune (CTS) (art. 5, Capitolul 3 din Directiva 98/79/CE) și s-a efectuat pentru ambele proceduri de incubare (standard și de scurtă durată).

1. LIMITE DE DETECTARE

Limita de detectare a probei a fost calculată folosindu-se procedura de incubare de scurtă durată, conform prevederilor Standardului de Lucru Britanic pentru detectarea anticorpilor anti-HCV, NIBSC cod 06/188-006. Tabelul de mai jos cuprinde valorile medii de DO450nm prevăzute de acest standard, diluat în plasmă negativă și apoi analizat.

Diluare	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Plasmă Negativă	0,25	0,20	0,20

De asemenea, s-a analizat "in toto" eșantionul codificat Accurun 1 - seria 3000 – pus la dispoziție de Boston Biomedica Inc., USA și s-au obținut următoarele rezultate:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. SPECIFICITATE ȘI SENSIBILITATE DE DIAGNOSTIC

Analiza performanței trusei s-a realizat printr-o testare externă, efectuată pe un număr de peste 5000 de eșantioane.

2.1 Specificitatea diagnosticului

Reprezintă probabilitatea ca proba să dea un rezultat negativ, în lipsa unei probe de analizat specifice. Au fost examinați peste 5000 de donatori aleatori, inclusiv donatori pentru prima dată.

Specificitatea diagnosticului a fost verificată cu un test omologat US FDA.

Au fost testați 5043 donatori și s-a obținut o specificitate de 99.5%.

210 pacienți spitalizați au fost testați pentru HCV; s-a obținut o specificitate a diagnosticului de 99.5%. De asemenea, specificitatea diagnosticului a fost verificată și prin testarea unui număr de 162 eșantioane potențial interferente (cu alte boli infecțioase, anticorpi pozitivi E.coli, pacienți cu boli hepatice nevirale, pacienți supuși dializei, femei însărcinate, eșantioane intens hemolizate, lipemice etc.). S-a obținut o valoare a specificității de 100%.

Nu s-a observat nicio falsă reactivitate determinată de metoda de preparare a eșantioanelor. Atât plasmele, derivate prin diferite tehnici standard de preparare (citrut, EDTA și heparină), cât și serurile au fost utilizate pentru stabilirea valorilor de specificitate. Au fost testate eșantioane congelate, pentru a se verifica eventualele interferențe determinate de recoltare și conservare. Nu s-a depistat nicio interferență.

2.2 Sensibilitate de diagnostic

Reprezintă probabilitatea ca proba să dea un rezultat pozitiv, în lipsa unei probe de analizat specifice. Sensibilitatea de diagnostic a fost verificată extern, pe un număr total de 348 eșantioane; s-a obținut o sensibilitate de diagnostic de 100%. Intern, au fost testate peste 50 de eșantioane pozitive, obținându-se și de această dată o sensibilitate de diagnostic de 100%.

Au fost testate eșantioane pozitive la infecții provocate de alte genotipuri decât HCV.

Mai mult de atât, s-au studiat majoritatea panelurilor de sero-conversie puse la dispoziție de Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) și Zeptometrix, USA, (HCV).

Mai jos vă prezentăm rezultatele pentru unele dintre acestea.

Panel	Nr. eșantioane	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Notă:

1. Eșantioane pozitive
2. HCV v.3.0

De asemenea, produsul a fost testat pe panelul EFS Ac HCV, lot nr. 06.140817, produs de Etablissement Francais Du Sang (EFS), Franța, obținându-se următoarele rezultate:

Panel EFS Ac HCV

Eșantion	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Rezultate așteptate
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativ
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitiv
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitiv
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitiv
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitiv
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitiv

3. PRECIZIE

A fost calculată pe cinci eșantioane, unul negativ și patru pozitive, examinate prin 4 replicări, fiecare în șase runde separate.

S-au obținut următoarele rezultate:

Rezultate în cadrul aceluiași lot: Trusă EIAGEN HCV Ab (v.4) -

Primul lot (procedură incubare de scurtă durată)

		Precizie - %CV		
Eșantion	S/Co Medie	În interiorul Probei	Între Probe	Total
Negativ	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitive	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Rezultate în cadrul aceluiași lot: Trusă EIAGEN HCV Ab (v.4) -

Primul lot (procedură incubare de lungă durată)

		Precizie - %CV		
Eșantion	S/Co Medie	În interioru l Probei	Între probe	Total
Negativ	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitive	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Rezultate între loturi: Trusă EIAGEN HCV Ab (v.4) -

Primul, al 2-lea și al 3-lea lot (procedură incubare de scurtă durată)

		Precizie - %CV		
Eșantion	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
Negativ	8,65	8,29	6,13	
Calibrator	4,98	4,44	5,38	
Pozitiv	4,11	3,11	1,37	

Variabilitatea indicată în tabele nu s-a soldat cu erori de clasificare a eșantioanelor.

S. SUGESTII PENTRU SOLUȚIONAREA PROBLEMELOR

Respectarea strictă a procedurii și a specificațiilor, precum și o corectă utilizare a reactivilor și o distribuire corectă permit e

vitarea următoarelor tipuri de erori:

EROARE	CAUZE POSIBILE / SUGESTII
DO foarte diferite ($\pm 50\%$) față de cele indicate în CC	-reactivi aplicați în cantități eronate (sugestie: verificați conformitatea dintre cantitatea setată în pipete și cea prevăzută de test, etalonați din nou) -temperatură eronată sau timp de incubare eronat (sugestie: o întreținere mai atentă a incubatorului, notați ora de începere a incubării) -eroare în executarea fazelor de spălare și de citire fotometrică (sugestie: verificați corecta funcționare sau setările respectivelor dispozitive) -contaminarea substratului sau a conjugatului (sugestie: folosiți numai recipiente curate din plastic de unică folosință)
Repetabilitate redusă a rezultatelor	-reactivii și eșantioanele au fost aplicați în cantități care nu sunt constante (sugestie: verificați precizia pipetelor și conformitatea dintre cantitatea aplicată și cea prevăzută de test; etalonați din nou) -eroare în executarea fazelor de spălare sau de citire (sugestie: verificați corecta funcționare sau setările respectivelor dispozitive) -contaminarea substratului (sugestie: folosiți numai recipiente curate din plastic de unică folosință) -murdărirea sau degradarea reactivilor (sugestie: folosiți vârfuri adecvate, recipiente curate din plastic de unică folosință și apă distilată sau un produs echivalent)
Nicio reacție colorimetrică, după adăugarea substratului	-unii reactivi nu au fost adăugați -contaminare accentuată a conjugatului sau a substratului -executare greșită a procedurii de testare (de ex. aplicare accidentală a reactivilor într-o ordine greșită, sau din recipientul greșit etc.)
Reacție prea puțin intensă (DO prea mici)	-timp de incubare prea scurt, temperatură de incubare prea joasă -diluare eronată a conjugatului
Reacție prea intensă (DO prea mari)	-diluare eronată a conjugatului -timp de incubare prea lung, temperatură de incubare prea ridicată -calitate proastă a apei folosite pentru soluția de spălare (grad redus de deionizare) -spălare insuficientă (conjugatele nu au fost corect îndepărtate)
Rezultate inexplicabile	-contaminarea pipetelor, a vârfurilor sau a recipientelor -spălarea nu este constantă sau nu este suficientă (conjugatele nu au fost corect îndepărtate)
%CV în interiorul probei prea ridicat	-reactivii și/sau strip-urile nu au ajuns la temperatura camerei, înainte de utilizare -spălătorul pentru microplăci nu spală corect (sugestie: curățați capul spălătorului)
%CV între probe prea ridicat	-condițiile de incubare nu sunt constante (durată, temperatură) -controalele și eșantioanele nu au fost adăugate în același timp (cu aceleași pauze) (verificați ordinea de adăugare) -modificări cauzate de personalul operator

T. AUTOMATIZARE

Procedura descrisă în prezentul prospect cu instrucțiuni de utilizare se referă exclusiv la testul efectuat prin metoda manuală. În cazul utilizării unor sisteme de analiză automate, se vor urma instrucțiunile din cuprinsul manualelor de utilizare ale respectivelor dispozitive. Fiecare laborator trebuie să respecte propriile proceduri de validare internă, pentru a atesta conformitatea cu sistemele automatizate.

U. RESTRICȚII

Procentul de repetabilitate a unor rezultate fals pozitive, neconfirmate de analiza RIBA de confirmare, sau de alte metode similare, a fost stabilit ca fiind de sub 0,1% din populația normală.

Eșantioanele congelate ce conțin particule de fibrină sau cheaguri după congelare au dus la obținerea unor rezultate fals pozitive.

BIBLIOGRAFIE

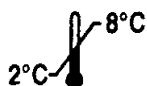
1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JL, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore—an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretsch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF	071067	 96
REF	071064	 192
REF	071068	 480



IVD



Данную инструкцию по применению необходимо внимательно прочитать перед использованием набора
Во время работы необходимо тщательно следовать этой инструкции
При любых отклонениях от данной инструкции по применению достоверность результатов исследования не гарантируется.



Производитель:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

ru

ОБОЗНАЧЕНИЯ, ИСПОЛЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ							
на русском языке RU							
	Медицинское устройство для диагностики в лабораторных условиях	Номер по каталогу	Номер партии	Внимание, Прочитайте инструкции по использованию	Ограничение температуры	Срок годности	Количество испытаний
	Производитель	Беречь от попадания прямых солнечных лучей	Дата изготовления	Микропланшет	Положительная контрольная проба	Отрицательная контрольная проба	Калибратор
	Конъюгат	Дилуент для Образца	Субстрат ТМБ	Останавливающий раствор (0,5 M H ₂ SO ₄)	Конц. промывочного буфера (20x)	Оценочный разбавитель	Восстановление с помощью x мл
	Биологическая опасность	Опасно	Предупреждение				

Внимание:

Останавливающий раствор классифицирован как: Повр. кожи 1A



- **Сигнальное слово:**
Опасность
- **Обуславливающий опасность продукта компонент (компоненты) для этикетирования:**
Серная кислота
- **Предупреждения об опасности:**
H314 Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
- **Меры Предосторожности:**
P260 Не вдыхать пыль/дым/газ/туман/пары/вещество в распыленном состоянии.
P303+P361+P353 При попадании на кожу (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду, промыть кожу водой/под душем.
P305+P351+P338 При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P310 Немедленно обратиться в токсикологический центр или к врачу.
P405 Хранить под замком.
P501 Утилизировать содержимое контейнера / контейнер в соответствии с предписаниями местных / региональных / национальных / международных компетентных служб.

Внимание:

Отрицательная контрольная проба, Положительная контрольная проба, Калибратор, Конъюгат, Дилуент для Образца, Оценочный разбавитель, Конц. промывочного буфера (20x) классифицированы как: Чувств. кожи 1



- **Сигнальное слово:**
Предупреждение
- **Обуславливающий опасность продукта компонент (компоненты) для этикетирования :**
Реакционная масса 5-хлор-2- метил-4-изотиазолин-3-она [ЕС-Номер. 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-она [ЕС-Номер. 220-239-6] (3:1)
- **Предупреждения об опасности:**
H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию
- **Меры Предосторожности:**
P261 Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в распыленном состоянии.
P280 Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица.
P321 Особое использование (смотри этикетку).
P333+P313 При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
P302+P352 При попадании на кожу: Промыть большим количеством воды
P501 Утилизировать содержимое контейнера / контейнер в соответствии с предписаниями местных / региональных / национальных / международных компетентных служб.

Информация о Паспортах безопасности (SDS) размещена на сайте www.adaltis.net.

А. НАЗНАЧЕНИЕ

Ферментативный иммуноферментный анализ (ИФА) четвертого поколения предназначен для определения антител к вирусу гепатита С в плазме и сыворотке человека. Набор может использоваться для скрининга компонентов крови пациентов, инфицированных гепатитом С.

Анализ предназначен только для диагностики «in vitro».

В. ВВЕДЕНИЕ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет гепатит С следующим образом:

«Гепатит С представляет собой вирусную инфекцию печени, которая упоминалась в качестве передаваемой парентерально в качестве «не А- и не В-гепатита» до идентификации возбудителя в 1989 году. Открытие и характеристика вируса гепатита С привели к пониманию его роли в гепатите после трансфузии и его склонности вызывать постоянную инфекцию.

Гепатит С является основной причиной острого гепатита и хронического заболевания печени, включая цирроз и рак печени. В глобальном масштабе, по оценкам, 170 миллионов человек хронически инфицированы гепатитом С, а 3-4 миллиона человек заражаются каждый год. гепатит С, который распространяется главным образом путем прямого контакта с кровью человека. Основными причинами заражения гепатитом С во всем мире являются использование неэкранированных переливаний крови и повторное использование игл и шприцев, которые не были надлежащим образом стерилизованы. В настоящее время не существует вакцины для профилактики гепатита С, а лечение хронического гепатита С является слишком дорогостоящим в развивающихся странах для большинства людей. Таким образом, с глобальной точки зрения, наибольшее влияние на бремя гепатита С, вероятно, будет достигнуто путем сосредоточения усилий на снижении риска передачи гепатита С от внутрибольничных воздействий (например, при переливании крови, или применении небезопасных методов инъекций), а также высокий риск при зависимостях (например, введение наркотических веществ).

Вирус гепатита С является одним из вирусов (А, В, С, D и E), которые вместе составляют подавляющее большинство случаев вирусного гепатита. Он представляет собой окутанный РНК-вирус в семействе вирусов *flaviviridae*, который, как представляется, имеет узкий диапазон его носителей. Люди и шимпанзе являются единственным известным видом, восприимчивым к инфекции, причем подобное заболевание развивается у обоих видов. Важной особенностью вируса является относительная изменчивость его генома, что, в свою очередь, вероятно, связано с высокой склонностью (80%) к индуцированию хронической инфекции. гепатит С сгруппирован в

несколько различных генотипов, которые могут иметь важное значение для определения тяжести заболевания и реагирования на лечение.

Инкубационный период заражения гепатитом С, до появления клинических симптомов, составляет от 15 до 150 дней. При острых инфекциях наиболее распространенными симптомами являются усталость и желтуха; однако большинство случаев (от 60% до 70%), даже те, которые развивают хроническую инфекцию, являются асимптоматическими. Около 80% новорожденных пациентов проявляют развитие хронической инфекции. Цирроз развивается у примерно 10-20% людей с хронической инфекцией, а рак печени развивается у 1% -5% лиц с хронической инфекцией в течение 20-30 лет. Большинство пациентов, страдающих раком печени, у которых отсутствует инфекция вируса гепатита В, свидетельствуют о наличии инфекции гепатита С. Механизмы, с помощью которых инфекция гепатита С приводит к раку печени, все еще неясны. Гепатит С также усугубляет тяжесть основного заболевания печени, когда он сосуществует с другими печеночными состояниями. В частности, заболевание печени прогрессирует быстрее среди людей с алкогольным заболеванием печени и инфекцией гепатита С. Гепатит С распространяется главным образом путем прямого контакта с кровью человека. Хорошо документирована передача через переливание крови, которые не прошли скрининг на инфекцию гепатита С, путем повторного использования неадекватно стерилизованных игл, шприцев или другого медицинского оборудования или путем обмена игл среди потребителей наркотиков. Также может возникать сексуальная и перинатальная передача, хотя подобные случаи возникают реже. При этом могут возникать и другие способы передачи, такие как социальные, культурные, и поведенческие практики, использующие чрескожные процедуры (например, пирсинг ушей и тела, обрезание, татуировка), если используется неадекватно стерилизованное оборудование. гепатит С не распространяется путем чихания, обнимания, кашля, принятия пищи или воды, совместного использования посуды или случайного контакта.

В развитых и развивающихся странах группы высокого риска включают потребителей инъекционных наркотиков, получателей неэкранированной крови, больных гемофилией, пациентов с диализом и лиц с несколькими половыми партнерами, которые занимаются небезопасным сексом. В развитых странах считается, что 90% лиц с хронической инфекцией гепатита С являются текущими и бывшими потребителями инъекционных наркотиков, а также лицами, имеющими историю переливания неэкранированной крови или продуктов крови. Во многих развивающихся странах, где все еще используются неэкранированные продукты крови и цельной крови, основным средством передачи являются нестерилизованное инъекционное оборудование и неэкранированные переливания крови. Кроме того, люди, которые используют традиционные методы скарификации и обрезания, подвергаются риску, если они используют или

повторно используют нестерилизованные инструменты.

Согласно оценкам ВОЗ, около 170 миллионов человек, составляющих 3% населения мира, инфицированы гепатитом С и подвержены риску развития цирроза печени и/или рака печени. Распространенность инфекции гепатита С в некоторых странах Африки, Восточного Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана (когда имеются данные о распространенности) является высокой, по сравнению с некоторыми странами Северной Америки и Европы.

Диагностические тесты для гепатита С используются для предотвращения заражения путем скрининга донорской крови и плазмы, установления клинического диагноза и принятия более эффективных решений в отношении медицинского лечения пациента. Диагностические тесты, имеющиеся в продаже сегодня, основаны на иммуноферментных анализах (EIA) для выявления специфических антител к гепатиту С. EIA могут обнаруживать более 95% хронически инфицированных пациентов, но могут обнаруживать только от 50% до 70% острых инфекций. Рекомбинантный иммуноблот-анализ (RIBA), который идентифицирует антитела, которые реагируют с отдельными антигенами гепатита С, часто используется в качестве дополнительного теста для подтверждения положительного результата EIA. Тестирование на гепатит С, циркулирующее с помощью тестов амплификации РНК (например, полимеразная цепная реакция или ПЦР, анализ разветвленной ДНК) также используется для подтверждения серологических результатов, а также для оценки эффективности противовирусной терапии. Положительный результат указывает на наличие активной инфекции и потенциал распространения инфекции, и/или развитие хронического заболевания печени.

Противовирусные препараты, такие как интерферон, взятые отдельно или в сочетании с рибавирином, могут использоваться для лечения пациентов с хроническим гепатитом С, но стоимость лечения является очень высокой. Лечение только интерфероном эффективно примерно у 10-20% пациентов. Интерферон, в сочетании с рибавирином, эффективен примерно у 30-50% пациентов. Рибавирин, по всей видимости, не является эффективным, если используется в одиночку.

Вакцины против гепатита С отсутствуют. Исследования ведутся, но высокая изменчивость генома гепатита С усложняет развитие вакцины. Отсутствие знаний о любом защитном иммунном ответе после инфицирования гепатитом С также препятствует проведению исследований вакцин. При этом неизвестно, способна ли иммунная система устранить вирус.

Однако, некоторые исследования продемонстрировали наличие антител,

нейтрализующих вирус у пациентов с гепатитом С-инфекцией. В отсутствие вакцины необходимо принять все меры предосторожности для предотвращения инфекции, включая (а) скрининг и тестирование доноров крови и органов; (b) инаktivация вируса в продуктах, полученных из плазмы; (с) внедрение и поддержание практики инфекционного контроля в медицинских учреждениях, включая соответствующую стерилизацию медицинского и стоматологического оборудования; (d) содействие изменению поведения среди широкой общественности и работников здравоохранения с целью сокращения чрезмерного использования инъекций и использования безопасных методов инъекций; и (е) консультирование по вопросам снижения риска для лиц с высоким риском, употребляющих наркотики и ведущие небезопасную сексуальную жизнь».

Геном кодирует структурные компоненты, нуклеокапсидный белок и два огибающих гликопротеина, а также функциональные компоненты, участвующие в репликации вируса и обработке белка. Регионы, кодирующие нуклеокапсид, являются наиболее консервативными среди изолятов, полученных во всем мире.

С. ПРИНЦИП ИСПЫТАНИЯ

Микропланшеты покрыты гепатит С-специфическими антигенами, полученными из областей «core» и «p24», кодирующих консервативные и иммунодоминантные антигенные детерминанты (пептид ядра, рекомбинантные NS3, NS4 и NS5-пептиды).

Твердую фазу сначала обрабатывают разбавленным образцом, и гепатит С Ab захватывается, если он присутствует, с помощью антигенов. После вымывания всех других компонентов образца, во 2-й инкубации связываются антитела к гепатиту С, IgG и IgM, а также они обнаруживаются путем добавления поликлональных специфических антител против hIgG & M, меченных пероксидазой (HRP).

Фермент, захваченный на твердой фазе, действующий на субстратную смесь TMB, генерирует оптический сигнал, который пропорционален количеству антител против гепатита С, присутствующих в образце. Урезанное значение отсечки позволяет интерпретировать оптические плотности антитела к гепатиту С отрицательным и положительным результатам.

D. КОМПОНЕНТЫ

В комплект входят реагенты для 96 тестов (код 071067), 192 теста (код 071064) или 480 тестов (код 071068).

Микропланшет	1
Отрицательный контроль	1x4 мл/флакон
Положительный контроль	1x2 мл/флакон
Калибратор	2 флакона
Концентрат промывочного буферного раствора 20х	1x50 мл/флакон
Конъюгат	1x16 мл/флакон
Раствор для разбавления образца	1x50 мл/флакон
Субстрат ТМВ	1x16 мл/флакон
Стоп раствор	1x15 мл/флакон
Оценочный разбавитель	1x8 мл/флакон
Фольгированная пленка для герметизации планшета	2
Количество тестов	96
Код	071067

Микропланшет	2
Отрицательный контроль	2x4 мл/флакон
Положительный контроль	1x4 мл/флакон
Калибратор	3 флакона
Концентрат промывочного буферного раствора 20х	2x50 мл/флаконы
Конъюгат	2x16 мл/флаконы
Раствор для разбавления образца	2x50 мл/флаконы
Субстрат ТМВ	2x16 мл/флаконы
Стоп раствор	2x15 мл/флаконы
Оценочный разбавитель	2x8 мл/флакон
Фольгированная пленка для герметизации планшета	4
Количество тестов	192
Код	071064

Микропланшет	5
Отрицательный контроль	1x20 мл/флакон
Положительный контроль	1x10 мл/флакон
Калибратор	7 флаконов
Концентрат промывочного буферного раствора 20х	5x50 мл/флаконы
Конъюгат	2x40 мл/флаконы
Раствор для разбавления образца	5x50 мл/флаконы
Субстрат ТМВ	2x40 мл/флаконы
Стоп раствор	2x40 мл/флаконы
Оценочный разбавитель	1x40 мл/флакон
Фольгированная пленка для герметизации планшета	10
Количество тестов	480
Код	071068

1. Микропланшет

12 стрипов по 8 лунок покрыты пептидом ядра, рекомбинантными пептидами NS3, NS4 и NS5. Планшет запечатывали в алюминиевый пакет с осушителем.

Микропланшет доводят до комнатной температуры (+18...24°C) перед вскрытием пакета. Неиспользованные стрипы подлежат возврату в пакет, а пакет подлежит обратному запечатыванию и хранению при +2...8°C, в присутствии осушителя.

2. Отрицательный контроль

Контрольный раствор готов к использованию. Содержит 10 мМ Na-цитратного буферного раствора с уровнем pH 6,0±0,1, 2% казеина в качестве белковой основы и 0,1% Proclin 150 в качестве консерванта. Отрицательный контроль имеет оливково-зеленый цвет.

3. Положительный контроль

Контрольный раствор готов к использованию. Содержит 1% белков сыворотки козы, антитела человека к гепатиту С, 10 мМ Na-цитратного буферного раствора с уровнем pH 6,0±0,1, 0,5% Tween 20, 0,09% азида натрия и 0,1% Proclin 150 в качестве консервантов. Положительный контроль имеет темно-зеленый цвет.

Важное примечание. Отсутствие жизнеспособных патогенов в позитивном контроле не может быть полностью обеспечено, и, следовательно, реагент следует обрабатывать как потенциально биологически опасный, в соответствии с надлежащей лабораторной практикой.

4. Калибратор

Лиюфилизированный калибратор. Растворить объемом воды класса EIA, указанной на этикетке. Вещество содержит белки фетальной бычьей сыворотки, человеческие антитела к гепатиту С, содержание которых откалибровано по стандарту NIBSC, 10 мМ Na-цитратный буфер pH 6,0±0,1, 0,3 мг/мл сульфата гентамицина и 0,1% Proclin 150 в качестве консервантов.

Важное примечание. Отсутствие жизнеспособных патогенов в калибраторе не может быть полностью обеспечено, поэтому реагент следует обрабатывать как потенциально биологически опасный, в соответствии с надлежащей лабораторной практикой.

Примечание: Объем, необходимый для растворения содержимого флакона, может варьироваться в зависимости от партии. Пожалуйста, используйте правильный объем, указанный на этикетке.

5. Концентрат промывочного буферного раствора 20х

20х – кратный концентрированный раствор. После разбавления промывочный раствор (разбавленный промывочный буферный раствор) содержит 10 мМ фосфатного буфера с уровнем pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 и 0.05% Proclin 150.

После разбавления промывочный раствор стабилен в течение 1 недели при температуре хранения +2...8°C.

6. Конъюгат

Готовый к использованию кодированный реагент красного цвета. Содержит конъюгированные пероксидазой хрена поликлональные козы антитела, к человеческим антителам IgG и IgM, 5% бычьего сывороточного альбумина, 10 мМ цитратного буфера с pH 6.4±0,1, 0,1% Proclin 150 и 0,05% Tween 20 в качестве консервантов.

7. Субстрат TMB

Готовый компонент. Содержит 50 мМ цитратно-фосфатного буфера с pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксида, 0.03% тетраметилбензидина (TMB) и 0.02% перекиси водорода (H₂O₂). Перед использованием осторожно перемешать.

Примечание: Хранить в защищенном от света месте, т.к. препарат чувствителен к яркому освещению.

8. Аналитический разбавитель

Готовый компонент. Содержит козью сыворотку, 10 мМ трис-буферный раствор с pH 8.0±0.1, содержащий 0.1% Proclin 150 и 0.09% азида натрия, для предварительной обработки образцов и контролей в планшете, блокируя интерференцию.

9. Стоп раствор

Готовый компонент. Раствор содержит 0,3 М раствора H₂SO₄. Перед использованием осторожно перемешать.

10. Разбавитель образца

Готовый к использованию компонент, имеет темно-зеленый цвет. Он содержит 1% казеина, 10 мМ Na-цитратного буфера с уровнем pH 6,0 ± 0,1 и 0,1% Proclin 150 в качестве консерванта. Используется для разбавления образца.

Примечание: в присутствии образца разбавитель изменяет цвет от оливкового зеленого до темно-голубовато-зеленого.

Е. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Калиброванные микропипетки (200 мкл и 10 мкл) и одноразовые пластиковые наконечники.
2. Вода класса EIA (бидистиллированная или деионизированная, обрабатывается углем для удаления окислительных химикатов, используемых в качестве дезинфицирующих средств).
3. Таймер с диапазоном 60 минут или выше.
4. Абсорбирующие бумажные ткани.
5. Калиброванный термостатический инкубатор с микропланшетами ELISA, способный обеспечивать температуру + 37°C.
6. Калиброванный считыватель микроочечек ELISA с 450 нм (чтение) и, возможно, с фильтрами 620-630 нм (гашение).
7. Калиброванный микропланшет ELISA.
8. Вихревые или аналогичные смесительные инструменты.

Ф. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор должен использоваться только квалифицированным и надлежащим образом подготовленным техническим персоналом, под наблюдением врача, отвечающего за лабораторию.
Вкладыш в упаковке необходимо внимательно прочитать перед использованием продукта.
2. Перед использованием продукта, внимательно прочтите Паспорт безопасности (ПБ).

3. Когда набор используется для скрининга единиц крови и компонентов крови, он должен использоваться в лаборатории, сертифицированной и соответствующей национальным органом в этой области (министерство здравоохранения или аналогичная организация) для проведения такого рода анализа.
4. Весь персонал, участвующий в проведении анализа, должен носить защитную лабораторную одежду, не содержащие тальк перчатки и очки. Следует избегать использования любых острых (игольчатых) или режущих (снабженных лезвиями) устройств. Весь персонал должен быть обучен процедурам биобезопасности, которые были рекомендованы Центром по контролю за заболеваниями, Атланта, США, и сообщается в публикации Национального института здравоохранения: «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях», под ред. 1984.
5. Весь персонал, занимающийся обработкой образцов, должен быть вакцинирован против HBV и HAV, для которых доступны безопасные и эффективные вакцины.
6. Лабораторную среду следует контролировать таким образом, чтобы избежать загрязнения, например, от пыли или микроорганизмов, возникающих при вдыхании воздуха, при открытии флаконов и микропланштов и при проведении теста. Защитите подложку (TMB) от воздействия сильного света и избегайте вибрации поверхности рабочего стола, на котором проводится испытание.
7. После получения, храните комплект при температуре +2...8°C в холодильнике с регулируемой температурой или в холодной комнате.
8. Не меняйте компоненты между различными партиями наборов. Рекомендуются, чтобы компоненты между двумя наборами одного и того же лота не заменялись.
9. Убедитесь в том, что реагенты чистые и не содержат видимых тяжелых частиц или агрегатов. Если нет, посоветуйте начальнику лаборатории инициировать необходимые процедуры замены набора.
10. Избегайте перекрестного заражения между образцами сыворотки/плазмы, используя одноразовые наконечники и меняя их после каждого образца.
11. Избегайте перекрестного заражения между реагентами набора, используя одноразовые наконечники и меняя их между использованием каждого из них.
12. Не используйте комплект после истечения срока годности, указанного на внешнем контейнере и внутренних этикетках (флаконах).
13. Необходимо обрабатывать все образцы как потенциально инфицированные. Все образцы человеческой сыворотки должны быть обработаны на уровне биобезопасности 2, согласно рекомендациям Центра по контролю за заболеваниями, Атланта, США, а также в соответствии с опубликованной информацией в

«Институте здравоохранения»: «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях», изд. 1984.

14. При подготовке жидких компонентов или при переносе компонентов в автоматизированные рабочие места, во избежание перекрестного загрязнения, рекомендуется использование одноразовой пластиковой посуды.
15. Отходы, образующиеся при использовании набора, должны быть утилизированы в соответствии с национальными директивами и законами, касающимися лабораторных отходов химических и биологических веществ. В частности, жидкие отходы, образующиеся в процессе промывки и из остатков контролей и из образцов, должны рассматриваться как потенциально инфекционные материалы и инактивированы перед утилизацией. Предлагаемые процедуры инаktivации - обработка 10% конечной концентрацией бытового отбеливателя в течение 16-18 часов или инаktivации тепла автоклавом при 121°C, в течение 20 мин.
16. Случайные проливы образцов, во время проведения манипуляций, должны адсорбироваться бумажными тканями, пропитанными домашним отбеливателем, а затем водой. Затем ткани следует утилизировать в надлежащих контейнерах, предназначенных для лабораторных/больничных отходов.
17. Стоп раствор содержит 0,3 М серной кислоты. Необходимо избегать попадания на кожу и глаза. В случае контакта, немедленно промыть большим количеством воды.
18. Утилизируйте растворы реагентов, содержащие азид натрия, в качестве консервантов в соответствии со всеми местными, государственными и национальными правилами. Для утилизации реагентов, содержащих азид, промойте их обильным количеством воды. Утилизируйте с осторожностью, так как азид натрия может образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с свинцовым или медным трубопроводом.
19. Не курить, не есть, не пить или не применять косметику в местах, где обрабатываются образцы или реагенты набора
20. Другие отходы, полученные при использовании набора (пример: наконечники, используемые для образцов и контролей, использованные микропланшеты), должны обрабатываться как потенциально инфицированные и утилизироваться в соответствии с национальными директивами и законами, касающимися лабораторных отходов.
21. Не пипетируйте ртом.

G. ОБРАЗЕЦ: ПОДГОТОВКА И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Кровь отбирается асептически с помощью венепункции, а плазму или сыворотку получают с использованием стандартных методов приготовления образцов для клинического лабораторного анализа. При этом какое-либо влияние на приготовление образца с цитратом, ЭДТА и гепарином не наблюдалось.

2. Избегайте добавления консервантов в образцы; особенно азид натрия, поскольку это химическое вещество влияет на ферментативную активность конъюгата, создавая ложные отрицательные результаты.
3. Образцы должны быть четко идентифицированы с кодами или названиями, чтобы избежать неправильной интерпретации результатов. Если набор используется для скрининга единиц крови, настоятельно рекомендуется маркировка в виде штрихового кода для электронного считывания.
4. Гемолизированные (красные) и очевидно гиперлипемические («молочные») образцы должны быть отклонены, поскольку они способны генерировать ложные результаты. Образцы, содержащие остатки фибрина, тяжелых частиц или микробных нитей и фракций, должны быть отклонены, поскольку они могут привести к ложным результатам.
5. Сыворотку и плазму можно хранить при температуре +2...8°C в течение пяти дней после забора. В течение более длительного периода хранения образцы могут храниться в замороженном состоянии при -20°C в течение нескольких месяцев. Любые замороженные образцы не должны быть заморожены/разморожены более одного раза, так как это может привести к образованию частиц, которые могут повлиять на результат теста.
6. Если присутствуют частицы, центрифугируйте при 2.000 об/мин в течение 20 минут или фильтруйте с использованием фильтров 0,2-0,8µ для очистки образца для тестирования.

H. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

В исследовании, проведенном на вскрытом комплекте, не было отмечено какой-либо существенной потери активности до 1 повторного использования комплекта и до 6 месяцев.

1. Микропланшеты:

Дайте микропланшету достичь комнатной температуры (около 1 часа), прежде чем вскрывать пакет. Убедитесь в том, что осушитель не приобрел темно-зеленый цвет, что указывает на дефект в производстве. В этом случае позвоните в службу поддержки Adaltis.

Неиспользованные полоски должны быть помещены обратно внутрь алюминиевого пакета вместе с влагопоглотителем, надежно застегнутым молнией и хранящимся при +2...8°C. После первого открытия оставшиеся полосы устойчивы до тех пор, пока индикатор влажности внутри пакета осушителя не станет желтым и зеленым.

2. Отрицательный контроль:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо взболтайте, методом встряхивания.

3. Положительный контрольный раствор:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания. Обращайтесь с этим компонентом как потенциально инфицированным.

4. Калибратор:

Тщательно растворите содержимое лиофилизированного флакона в объеме воды класса EIA, указанной на его этикетке. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

Обращайтесь с этим компонентом как потенциально инфицированным.

Примечание: при растворении калибратор нестабилен. Хранить в аликвотах при -20°C .

5. Концентрат промывочного буферного раствора 20x (флакон 50 мл):

Все содержимое 20-кратного концентрированного раствора должно быть разбавлено водой класса EIA до 1000 мл (объем указан на этикетке) и перед использованием хорошенько перемешать, встряхивая и держа флакон горизонтально. Поскольку некоторые кристаллы соли могут присутствовать во флаконе, позаботьтесь о растворении всего содержимого при приготовлении раствора. Во время подготовки избегать вспенивания, поскольку присутствие пузырьков может повлиять на эффективность циклов промывки.

Примечание: после разбавления промывочный раствор стабилен в течение 1 недели при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.

6. Конъюгат:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте методом встряхивания.

Соблюдайте осторожность, чтобы не загрязнять жидкость окисляющими химикатами, пылью или микробами, перемещаемыми по воздуху. Если этот компонент должен быть перенесен, используйте только пластиковые, и по возможности, стерильные одноразовые контейнеры.

7. Субстрат ТМВ:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания. Избегайте загрязнения жидкости окислителями, пылью или микробами. Не подвергайте воздействию сильного освещения, окислителей и металлических поверхностей. Если этот компонент должен быть перенесен, используйте только пластиковый и, если возможно, стерильный одноразовый контейнер.

8. Разбавитель для анализа:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

9. Стоп раствор:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

10. Разбавитель образца:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

I. ПРИБОРЫ И ИНСТРУМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В СОЧЕТАНИИ С КОМПЛЕКТом

1. Микропипетки должны быть откалиброваны таким образом, чтобы вливать правильный объем, необходимый для анализа, а также должны представляться на регулярной основе на обеззараживание (бытовой спирт, 10%-ный раствор хлорной извести, дезинфицирующие средства больницы класса) из тех частей, которые могут случайно войти в контакт с образцом или компонентами набора. Их также следует регулярно подвергать обслуживанию, в целях демонстрации точности 1% и достоверности $\pm 2\%$. Также необходимо регулярно проводить дезактивацию разливов или остатков компонентов комплекта.
2. Инкубатор ELISA должен быть установлен на $+37^{\circ}\text{C}$ (допуск $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) и регулярно проверяться для обеспечения правильной температуры. Для инкубации подходят как сухие инкубаторы, так и водяные ванны, при условии, что прибор проверяется на инкубацию тестов ELISA.
3. Устройство для промывания ELISA чрезвычайно важно для общих характеристик анализа. Устройство для промывания должно быть тщательно проверено и правильно оптимизировано. Обычно для обеспечения выполнения анализ ожидаемыми методами, достаточно 4-5 циклов промывки (аспирация + диспенсация 350 мкл/на лунку промывочного раствора = 1 цикл). Предлагается время выдержки, составляющее 20-30 секунд между циклами. Чтобы правильно установить их количество, рекомендуется провести анализ с помощью элементов управления/калибратора набора и хорошо охарактеризованных отрицательных и положительных эталонных образцов, а также проверить, чтобы они соответствовали значениям, указанным ниже в разделах О «Внутреннем контроле качества». Регулярная калибровка поставляемых и поддерживаемых объемов (обеззараживание и чистка игл) с помощью промывочной установки, должна выполняться в соответствии с инструкциями производителя.
4. Допуск времени инкубации составляет $\pm 5\%$.
 - ✓ Метод короткой инкубации (для 1/2-го цикла инкубации между 43 мин до 47 мин, для 3-го цикла инкубации между 14 и 16 мин).
 - ✓ Стандартный метод инкубации (для 1-й инкубационной дозы от 57 мин до 63 мин, для 2-го и 3-го циклов инкубации между 29 и 31 мин).
5. Ридер микропланшетов ELISA должен быть оснащен фильтром для чтения 450 нм и в идеале со вторым фильтром (620-630 нм) для гашения целей. Его стандартными характеристиками должны включать (а) полосу пропускания ≤ 10 нм; (b) диапазон поглощения от 0 до $\geq 2,0$; (c) линейность до $\geq 2,0$; повторяемость $\geq 1\%$. Бланкирование проводят на лунках, указанных в разделе «Процедура анализа». Оптическая система считывателя должна регулярно калиброваться для обеспечения правильной оптической плотности. Его следует регулярно

технически обслуживать в соответствии с инструкциями производителя.

6. При использовании автоматизированной рабочей станции ELISA все критические этапы (диспенсация, инкубация, промывка, считывание, встряхивание, обработка данных) должны быть тщательно настроены, откалиброваны, контролироваться и регулярно обслуживаться, чтобы соответствовать значениям, указанным в разделах О «Внутреннем качестве контрольного раствора». Протокол анализа должен быть установлен в операционной системе устройства и проверен как для промывочной установки, так и для считывателя. Кроме того, должна быть проверена правильная установка части для обработки жидкости (диспенсация и промывка). Особое внимание должно быть уделено избеганию переноса загрязнений с помощью игл, используемых для извлечения образцов и для промывки. Данные проблемы необходимо изучить и контролировать, чтобы свести к минимуму возможность загрязнения соседних лунок из-за сильно реактивных образцов, что способно привести к ложным положительным результатам.

L. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СРЕДСТВ КОНТРОЛЯ И МАНИПУЛЯЦИЙ

1. Проверьте дату истечения срока действия набора, напечатанного на внешней этикетке коробки с комплектом. Не используйте, если срок годности комплекта истек.
2. Убедитесь в том, что жидкие компоненты не загрязнены видимыми частицами или заполнителями невооруженным глазом. Убедитесь в том, что субстрат TMB бесцветный или бледно-голубой, аспирируя его небольшим объемом с помощью стерильной прозрачной пластиковой пипетки. Убедитесь в том, что при транспортировке не произошел поломка, и в коробке отсутствует утечка жидкости. Убедитесь в том, что алюминиевый пакет, содержащий микропланшет, не проколот или не поврежден.
3. Разбавьте все содержимое 20х концентрированного промывочного буфера, как описано выше.
4. Растворите калибратор, как описано выше.
5. Дайте всем остальным компонентам достичь комнатной температуры (около 1 часа) и затем перемешайте, как описано выше.
6. Установите инкубатор ELISA при температуре +37°C и подготовьте промывочную установку ELISA, заправляя разбавленным промывочным раствором в соответствии с инструкциями производителя. Установите правильное количество циклов промывки, как показано в разделе I.3.
7. Убедитесь в том, что ридер ELISA включен не менее чем за 20 минут до считывания.
8. Если вы используете автоматическую рабочую станцию, включите ее, проверьте настройки и убедитесь, что используете правильный протокол анализа.
9. Убедитесь в том, что микропипетки установлены на требуемый объем.

10. Убедитесь в том, что все другое оборудование доступно и готово к использованию.

11. В случае проблем не продолжайте тестирование и не проконсультируйтесь с руководителем.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Анализ должен проводиться в соответствии с данными, приведенными ниже, в целях поддержания такого же времени инкубации для всех образцов при тестировании.

Процедуру анализа можно проводить с помощью двукратных инкубационных процедур. Выберите ту процедуру, которую требуется выполнить по вашему правилу:

1. Стандартная инкубация (1-я инкубация 60 минут, 2-я и 3-я инкубация 30 минут)
2. Короткая инкубация (1-я и 2-я инкубация 45 минут, 3-я инкубация - 15 минут)

1. Стандартная инкубация. Ручной анализ:

1. Поместите необходимое количество микролунок в держатель микролунок. Оставьте 1-ю лунку пустой для манипуляции гашения.
2. Внесите 200 мкл отрицательного контроля в трех повторениях, 200 мкл калибратора в двух экземплярах и 200 мкл положительного контроля в одиночном цикле в надлежащих лунках. Не разбавляйте элементы управления и калибратора, поскольку они предварительно разбавлены, и готовы к использованию!
3. Добавьте 200 мкл разбавителя образца во все образцы лунок; затем распределите 10 мкл образца в каждой правильно идентифицированной лунке. Аккуратно перемешайте пластину, избегая переполнения и загрязнения соседних лунок, чтобы полностью диспергировать образец в его разбавителе.

Важное примечание: Убедитесь в том, что цвет разбавителя образца при добавлении образца изменяется от светло-зеленого до темно-синеватого зеленого цвета, таким образом контролируя действительное добавление образца.

4. Распределите 50 мкл анализируемого разбавителя во все контрольные/калибраторные и лунки для образцов. Убедитесь в том, что цвет образцов превратился в темно-синий.
5. Инкубируйте микропланшет в течение **60 минут при температуре +37°C**. Важное примечание. Полоски должны быть запечатаны с помощью клейкой уплотнительной фольги, наносимой только тогда, когда испытание проводится вручную. Не наносите полоски при использовании автоматических инструментов ELISA.
6. Промойте микропланшет с помощью автоматической промывочной установки путем подачи и аспирации 350 мкл/лунку разбавленного промывочного раствора, как сообщается в разделе I.3.
7. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку, за исключением 1-й гасительной лунки, и накройте герметичной пленкой. Убедитесь в том, что красный компонент окрасил все лунки, кроме A1.

Важное примечание: Будьте осторожны, не дотрагивайтесь до пластиковой внутренней поверхности лунки кончиком, заполненным ферментным конъюгатом, так как может возникнуть загрязнение.

8. Инкубируйте микропланшет в течение **30 мин при температуре +37°C**.
9. Промойте микролунки, как указано в разделе I.3.
10. Внесите 100 мкл смеси субстрата TMB в каждую лунку, включите пустую лунку. Затем инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (+18...24°C) в течение **30 минут**.

Важное примечание: Не подвергайте микропланшет сильному прямому освещению, так как может быть создан высокий фон.

11. Внесите 100 мкл стоп-раствора во все лунки, используя ту же последовательность пипетирования, что и на этапе 10, чтобы остановить ферментативную реакцию. Добавление стоп-раствора приведет к положительному контролю и положительным образцам от синего до желтого.
12. Измерьте интенсивность цвета раствора в каждой лунке, как описано в разделе I.5, при использовании 450 нм фильтра (чтение) и, возможно, на 620-630 нм (вычитание фона), с помощью гасящего инструмента на A1.

Важные примечания:

1. Если второй фильтр недоступен, убедитесь в том, что на нижней панели микросхемы нет отпечатков пальцев до считывания при 450 нм. Отпечатки пальцев могут генерировать ложные положительные результаты при чтении.
2. Чтение идеально должно выполняться сразу после добавления остановочного раствора, но, безусловно, не более чем через 20 минут после добавления. Может происходить некоторое самоокисление субстрата, что приводит к более высокому фону.
3. Было доказано, что встряхивание при 350 ± 150 об/мин во время инкубации повышает чувствительность анализа около 20%.

2. Короткая инкубация. Ручной анализ:

1. Поместите необходимое количество микроволн в держатель микроячейки. Оставьте 1-ю лунку пустой для операции гашения.
2. Внесите 200 мкл отрицательного контроля в трех повторениях, 200 мкл калибратора в двух экземплярах и 200 мкл положительного контроля в одиночной соответствующей лунке. Не разбавляйте элементы управления и калибратора, поскольку они предварительно разбавлены, готовы к использованию!
3. Добавьте 200 мкл разбавителя образца во все образцы лунок; затем распределите 10 мкл образца в каждой правильно идентифицированной скважине. Аккуратно перемешайте пластину, избегая переполнения и

загрязнения соседних лунок, чтобы полностью диспергировать образец в его разбавителе.

Важное примечание: Убедитесь в том, что цвет разбавителя образца при добавлении образца изменяется от светло-зеленого до темно-синеватого зеленого цвета, контролируя, что образец действительно добавлен.

4. Распределите 50 мкл анализируемого разбавителя во все контрольные/калибраторные и лунки для образцов. Убедитесь в том, что цвет образцов превратился в темно-синий.
5. Инкубируйте микропланшет в течение 45 минут при температуре +37°C. Важное примечание. Полоски должны быть запечатаны с помощью клейкой уплотнительной фольги, поставляемой только тогда, когда испытание проводится вручную. Не закрывайте полоски при использовании автоматических инструментов ELISA.
6. Промойте микропланшет с помощью автоматической промывочной установки путем подачи и аспирации 350 мкл/лунку разбавленного промывочного раствора, как указано в разделе I.3.
7. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку, за исключением 1-й гасительной лунки, и накройте герметичной пленкой. Убедитесь в том, что красный компонент окрасил все лунки, кроме A1.

Важное примечание: Будьте осторожны, не дотрагивайтесь до пластиковой внутренней поверхности лунки кончиком, заполненным ферментным конъюгатом. Может возникнуть загрязнение.

8. Инкубируйте микропланшет в течение **45 минут при температуре + 37°C**.
9. Вымойте микролунки, как указано в разделе I.3.
10. Внесите 100 мкл смеси субстрата TMB в каждую лунку, включите пустую лунку. Затем инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (+18...24°C) в течение **15 минут**.

Важное примечание: Не подвергайте микропланшет сильному воздействию прямых солнечных лучей, так как может быть создан высокий фон.

11. Внесите 100 мкл стоп-раствора во все лунки, используя ту же последовательность пипетирования, что и в шаге 10, чтобы остановить ферментативную реакцию. Добавление стоп-раствора приведет к положительному контролю и положительным образцам от синего до желтого.
12. Измерьте интенсивность цвета раствора в каждой лунке, как описано в разделе I.5, при 450 нм фильтре (считывание) и, возможно, при 620-630 нм (вычитание фона), бланшируя прибор на A1.

Важные примечания:

1. Если второй фильтр недоступен, убедитесь, что на нижней панели микросхемы нет отпечатков пальцев до считывания при 450 нм. Отпечатки пальцев могут генерировать ложные положительные результаты при чтении.
2. Чтение должно идеально выполняться сразу после добавления стоп-раствора, но, безусловно, не более чем через 20 минут после этого. Некоторое самоокисление субстрата может происходить, приводя к более высокому фону.
3. Было доказано, что встряхивание при 350 ± 150 об/мин во время инкубации повышает чувствительность анализа около 20%.

N. СХЕМА АНАЛИЗА

Метод	Операции (Стандартная инкубация)	Операции (Короткая инкубация)
Контрольные растворы и калибраторы	200 мкл	200 мкл
Образец разбавителя и образец	200 мкл разбавителя + 10 мкл образца	200 мкл разбавителя + 10 мкл образца
Разбавитель для анализа	50 мкл	50 мкл
1-я инкубация	60 мин (± 3)	45 мин (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Шаг промывки	4-5 циклов	4-5 циклов
Конъюгат фермента	100 мкл	100 мкл
2-я инкубация	30 мин (± 1)	45 мин (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Шаг промывки	4-5 циклов	4-5 циклов
Субстрат TMB	100 мкл	100 мкл
3-я инкубация	30 мин (± 1)	15 мин (± 1)
Температура	Комнатная температура (+18...24°C)	Комнатная температура (+18...24°C)
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл
Чтение OD	450/620	450/620

Пример схемы диспенсации приведен ниже (действителен для обеих процедур инкубационного времени):

Микропланшеты

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Условные обозначения: BLK = пустой, NC = отрицательный контроль, CAL = калибратор PC = положительный контроль S = образец

O. ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Проверка проводится на средства управления и калибраторе каждый раз, когда набор используется в целях проверки, с возможностью обеспечения соответствия их значения OD450/620nm, которые приведены в таблице ниже.

Проверка	Требования
Бланковый раствор в лунке	<0.100 OD 450/620nm значение
Отрицательный контроль (NC)	<0,050 среднее OD 450/620 нм после гашения
Калибратор	S/Co > 1,1
Положительный контроль	> 1.000 OD 450/620nm значение

Если результаты теста соответствуют указанным выше требованиям, перейдите к следующему разделу.

Если они не достигнут этих значений, не продолжайте и не выполняйте следующие проверки:

Проблемы	Проверки
Бланковый раствор в лунке > 0.100 OD450nm	1. Проверьте отсутствие загрязнения раствора субстрата во время анализа.
Отрицательный контроль (NC) > 0,050 OD450nm после гашения	1. Убедитесь в том, что процедура промывки и настройки промывочной установки подтверждены в предварительном квалификационном исследовании; 2. Убедитесь в том, что был использован надлежащий моющий раствор, а устройство для промывания было заземлено перед использованием; 3. Убедитесь в том, что в процедуре анализа не было допущено ошибки (диспозиция положительного контроля вместо отрицательного раствора); 4. Убедитесь в том, что загрязнение отрицательного контроля или лунки, в которых проводился контроль, произошедшее из-за разливов положительных образцов или конъюгата фермента, отсутствует; 5. Убедитесь в том, что микропипетки не загрязнены положительными образцами или конъюгатом фермента. 6. Убедитесь в том, что иглы промывочной установки не закупорились или частично не перекрываются.
Калибратор S/Co < 1,1	1. Убедитесь в том, что процедура была выполнена правильно; 2. Убедитесь в том, что во время его распространения не произошло никакой ошибки (например, диспенсация отрицательного контроля вместо калибратора) 3. Убедитесь в том, что процедура промывки и настройки промывочной установки подтверждены в предварительном квалификационном исследовании; 4. Убедитесь в том, что никакого внешнего загрязнения калибратора не произошло.

Положительный контроль <1.000 OD450nm	1. Убедитесь в том, что процедура была выполнена правильно; 2. Убедитесь в том, что при распределении контроля не произошло никакой ошибки (диспенсация отрицательного контроля. В этом случае отрицательный контроль будет иметь значение OD450nm > 0.150. 3. Убедитесь в том, что процедура мойки и настройки промывочной установки подтверждены в предварительном квалификационном исследовании; 4. Убедитесь в том, что никакого внешнего загрязнения положительного контроля не произошло.
---	--

Если возникла какая-либо из вышеуказанных проблем, сообщите об этом руководителю для выполнения дальнейших действий.

Р. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты испытаний рассчитываются с помощью сокращенного значения, определенного по следующей формуле:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC среднее значение} + 0,350$$

Значение, найденное для теста, используется для интерпретации результатов, как описано в следующем параграфе.

Q. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты испытаний интерпретируются как отношение образца OD450nm и значения Cut-Off (или S/Co) в соответствии со следующей таблицей:

S/Co	Интерпретация
<0,9	Отрицательный
0,9 - 1,1	Сомнительный
> 1,1	Положительный

Отрицательный результат указывает на то, что пациент не был инфицирован гепатит С или что может быть проведено переливание крови. Любой пациент, у которого присутствует двусмысленный результат, должен снова тестироваться на втором образце, взятом через 1-2 недели у пациента и обследованных. При этом переливание с объема крови осуществляться не должно.

Положительный результат указывает на инфекцию гепатит С, и поэтому пациента следует лечить соответственно, или следует уничтожить данный объем крови.

Важные примечания:

- Интерпретация результатов должна проводиться под наблюдением ответственного за лабораторию, чтобы уменьшить риск ошибок и неверных истолкований.
- Любой положительный результат должен быть подтвержден альтернативным методом, способным обнаруживать антитела IgG и IgM (подтверждающий тест) до постановки диагноза вирусного гепатита.

- Как это было доказано в Оценке эффективности продукта, анализ способен обнаруживать сероконверсию к антигенам антителам к гепатит С раньше, чем некоторые другие коммерческие наборы. Поэтому положительный результат, не подтвержденный этими коммерческими наборами, не должен быть исключен как ложноположительный результат! Образец должен быть в любом случае отправлен на подтверждение.
- До тех пор, пока анализ способен обнаруживать также IgM-антитела, могут присутствовать некоторые несоответствующие результаты с другими коммерческими продуктами для обнаружения антител против гепатит С - без конъюгата относительно hlgM в рецептуре ферментного индикатора и, следовательно, отсутствия реактивности IgM. Реальная положительная реакция образца антител к гепатит С должна быть затем подтверждена путем подобного изучения реактивности IgM, важной для диагностики инфекции гепатит С.
- Когда результаты испытаний передаются из лаборатории в центр информатики, необходимо обратить внимание на избегание ошибочной передачи данных.
- Диагностика вирусной инфекции гепатита должна быть произведена и передана пациенту только квалифицированным врачом.

Ниже приведен пример расчета:

Следующие данные не должны использоваться вместо реальных цифр, полученных пользователем.

Отрицательный контроль: 0,019 - 0,020 - 0,021 OD450 nm

Среднее значение: 0,020 OD450nm Менее 0,050 - Принято

Положительный контроль: 2.189 OD450nm Более 1.000 - Принято

Сокращенные данные = 0,020 + 0,350 = 0,377

Калибратор: 0,550 - 0,530 OD450nm

Среднее значение: 0,540 OD450nm

S/Co = 1,4 S/Co выше 1,1 - Принято

Образец 1: 0,070 OD450 nm

Образец 2: 1,690 OD450 nm

Образец 1 S/Co <0,9 = отрицательный

Образец 2 S/Co > 1,1 = положительный

R. ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ

Оценка производительности была проведена в соответствии с условиями, приведенными в Общих технических спецификациях или CTS (статья 5, глава 3 Директивы 98/79/EC IVD) и в обеих процедурах инкубации (стандартной и короткой).

1. ОГРАНИЧЕНИЕ ОБНАРУЖЕНИЯ

Предел обнаружения анализа был рассчитан с использованием короткого анализа инкубации с помощью Британского рабочего стандарта для анти-

гепатит С, код NIBSC 06/188-006. В приведенной ниже таблице отображены средние значения OD450nm данного стандарта при разбавлении в отрицательной плазме и затем после анализа.

разбавление	Лот № 1	Лот № 2	Лот № 3
фактор	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Отрицательная плазма	0,25	0,20	0,20

Кроме того, образец, с кодовым названием Accurun 1 – серии 3000, предоставленный компанией Boston Biomedica Inc., США, был оценен «целиком», а результаты приведены ниже:

Серии Accurun 1	Лот № 1	Лот № 2	Лот № 3
Фактор	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Оценка эффективности устройства проводилась в испытании, проведенном более чем на 5000 образцов.

2.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность анализа подсчета отрицательных значений в отсутствие специфического аналитического раствора. Было обследовано в общей сложности более 5000 случайно отобранных доноров, включая доноров, привлеченных к исследованию впервые.

Диагностическая специфичность оценивалась касательно комплекта, утвержденного FDA США.

Была протестирована кровь 5043 доноров, обеспечивающих специфичность 99,5%. 210 госпитализированных пациентов были протестированы на гепатит С Ab; при этом была обнаружена диагностическая специфичность 99,5%. Более того, диагностическую специфичность оценивали путем тестирования 162 потенциально интерферирующих образцов (другие инфекционные заболевания, положительные антитела кишечной палочки, и пациенты, которые подверглись воздействию невирусных заболеваний печени, диализные пациенты, беременные женщины, гемолизированные, липемические пациенты и т. д.). Была оценена ценность специфичности в размере 100%.

При этом никакой ложной реактивности из-за метода подготовки образца не наблюдалось. Для определения значения специфичности использовались обе плазмы, полученные с использованием различных стандартных методов приготовления (цитрат, ЭДТА и гепарин) и сыворотки. Были проверены также замороженные образцы, чтобы проверить наличие помех из-за сбора и хранения. При этом никаких помех не наблюдалось.

2.2 Диагностическая чувствительность

Она определялась как вероятность анализа положительного результата подсчета в присутствии специфического аналитического раствора. Диагностическая чувствительность была оценена снаружи на общем количестве 348 экземпляров; диагностическая чувствительность составляла 100%. Внутри тестировались более 50 положительных образцов, в результате чего значение диагностической чувствительности снова составляло 100%. Были также проверены положительные образцы от инфекций, проводимых различными генотипами гепатит С.

Кроме того, было изучено большинство сероконверсионных панелей, доступных в Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) и Zeptometrix, USA (гепатит С).

Результаты приведены ниже для некоторых из них.

Панель	Образцы N°	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
гепатит С 10039	5	2	0
гепатит С 6212	9	6	7
гепатит С 10165	9	5	4

Примечание:

1. Выявленные положительные образцы
2. гепатит С v.3.0

Наконец, продукт был протестирован на панели EFS Ac гепатит С, серия № 06.140817, поставляемой Etablissement Francais Du Sang (EFS), Франция, со следующими результатами:

EFS Панель Ас гепатит С

Образец	Лот № 1 S/Co	Лот № 2 S/Co	Лот № 3 S/Co	В среднем стоимость
гепатит С 1	0,53	0,52	0,55	отрицательный
гепатит С 2	3,28	5,91	3,04	положительный
гепатит С 3	2,17	3,18	2,56	положительный
гепатит С 4	2,26	2,23	2,35	положительный
гепатит С 5	6,10	7,06	6,90	положительный
гепатит С 6	1,66	1,77	1,67	положительный

3. ТОЧНОСТЬ

Точность была рассчитана по пяти выборкам, с одним отрицательным и четырьмя положительными результатами, рассмотренными в 4 повторения каждого из шести отдельных циклов. Точность, полученная для обоих протоколов, является эквивалентной.

Результаты представлены следующим образом:

Результаты внутри лота: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1-й лот (короткий инкубационный анализ)

		Точность -% CV		
Образец	S/Co Среднее	В пределах цикла	Между циклами	Всего
Отрицательный	0.03	6,66	10,56	12,48
Положительный	1,20	8,52	8,49	12,03
	1,51	7,69	12,22	14,44
	3,57	7,43	11,82	13,97
	11,87	3,42	9,32	9,92

Результаты внутри лота: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1-й лот (длительный инкубационный анализ)

		Точность -% CV		
Образец	S/Co Среднее	В пределах цикла	Между циклами	Всего
Отрицательный	0.04	4,67	12,34	13,19
Положительный	1,47	9,62	11,40	14,92
	1,82	8,92	12,77	15,58
	4,31	4,59	12,88	13,67
	13,78	2,42	8,96	9,26

Результаты Inter-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1-й, 2-й и 3-й лоты (короткий инкубационный анализ)

	Точность -% CV		
Образец	Лот 1	Лот 2	Лот 3
Отрицательный	8,65	8,29	6,13
Калибратор	4,98	4,44	5,38
Положительный	4,11	3,11	1,37

Изменчивость, показанная в вышеприведенных таблицах, не привела к ошибочной классификации образца.

S. ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО УСТРАНЕНИЮ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Соблюдение процедуры и характеристик анализа, а также правильное использование реагентов и правильной пипетирование могут помочь избежать последующих ошибок.

ОШИБКА	ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ/ПРЕДЛОЖЕНИЯ
OD сильно отличаются ($\pm 50\%$) от OD, сообщенного по QC	-неправильный объем раскапывания реагентов (предложение: проверить соответствие между объемом, выдаваемым пипеткой, и объемом, необходимым для анализа, повторно откалибровать пипетки) -неправильная температура или неправильное время инкубации (предложение: больше внимания уделять для ухода за инкубатором, запишите время начала инкубации) -ошибка в промывке или при чтении фотометра (предложение: проверить работу или настройки соответствующих приборов) -загрязнение субстрата или конъюгата (предложение: использовать только одноразовые и чистые пластиковые контейнеры)
Низкая воспроизводимость результатов	-непостоянный объем дозирования образцов или реагентов (предположение: проверить точность пипеток и соответствие между объемом, выдаваемым пипеткой, и тем, который требуется для анализа, повторно откалибровать пипетки) -ошибка при промывке или чтении (предложение: проверьте работу или настройки соответствующих инструментов) -загрязнение субстрата (предположение: использовать только одноразовые и чистые пластиковые контейнеры) -загрязнение или деградация реагентов (предположение: используйте соответствующие наконечники, одноразовые и чистые пластиковые контейнеры для реагентов и высококачественной дистиллированной или эквивалентной воды)
Отсутствие колориметрической реакции после добавления субстрата	-не пипетирован какой-то реагент -сильное загрязнение конъюгата или субстрата -ошибки при выполнении процедуры анализа (например, случайное пипетирование реагентов в неправильной последовательности или из неправильного флакона, и т.д.)
слишком низкая реакция (слишком низкие OD)	-время инкубации слишком короткое, температура инкубации слишком низкая - правильное разведение конъюгата

слишком высокая реакция (слишком высокие OD)	-неправильное разведение конъюгата -слишком длительное время инкубации, слишком высокая температура инкубации -качество воды для промывочного буфера недостаточно (низкий уровень деионизации) -недостаточная промывка (конъюгаты не удалены должным образом)
необъяснимые выбросы	-загрязнение пипеток, наконечников или контейнеров - постоянная и недостаточная промывка (конъюгаты не удаляются должным образом)
слишком высокий внутренний CV%	-реагенты и/или полоски не были предварительно нагреты до комнатной температуры перед использованием - планшет в устройстве для промывания не промывается правильно (предложение: очистить устройство для промывания)
слишком высокий межоперационный CV%	-инкубационные условия не постоянны (время, температура) -контрольные образцы и образцы не выдаются одновременно (с одинаковыми интервалами) (проверьте порядок подачи пипетки), -человеческий фактор

T. АВТОМАТИЗАЦИЯ

Процедуры, указанные в настоящей Инструкции по применению, предназначены только для ручного тестирования. При использовании автоматических приборов, следуйте процедурам, содержащимся в руководстве оператора, предоставленном производителем устройства. Лаборатории должны следовать утвержденным процедурам проверки, чтобы продемонстрировать совместимость этого продукта с автоматизированными системами.

U. ОГРАНИЧЕНИЯ

Повторяющиеся ложноположительные результаты, не подтвержденные RIBA или аналогичные методы подтверждения, оценивались как менее 0,1% от нормальной популяции.

Наблюдались замороженные образцы, содержащие частицы фибрина или вещества после оттаивания, с получением ложных результатов.

СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

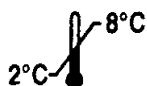
1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JL, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF	071067	 96
REF	071064	 192
REF	071068	 480



IVD



Ovo uputstvo se mora pažljivo pročitati pre upotrebe proizvoda.

Uputstva za izvođenje testa se moraju pažljivo pratiti.

Pouzdanost rezultata testa se ne može garantovati ukoliko ima odstupanja od datog uputstva.



Proizvođač:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

www.adaltis.net

sr

SIMBOLI KOJI SE KORISTE NA NALEPNICAMA

Srpski SR							
	Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku	Kataloški broj	Broj lota	Pažnj, Vidi uputstva za upotrebu	Ograničenje temperature	Koristi	Broj testa
				MICROPLATE	CONTROL+	CONTROL-	CAL
	Proizvođač	Držati dalje od sunčeve svetlosti	Datum izrade	Mikro-ploča	Sredstvo za pozitivnu kontrolu	Sredstvo za negativnu kontrolu	Kalibrator
	CONJ	DILSPE	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 20X	DILAS	RCNS x mL
	Konjugat	Diluent za uzorak	Supstrat TMB	Rastvor za zaustavljanje reakcije (H ₂ SO ₄ 0,3 M)	Pufer za pranje koncentracije (20x)	Diluent za probu	Ponovo uspostaviti sa x mL
	Biološka opasnost	Opasnost	Upozorenje				

Pažnja:

Rastvor za zaustavljanje reakcije klasifikuje se kao: Nagrizajući za kožu. 1A



- Reč koja označava signal:**
Opasnost
- Označavanje komponenti opasnosti:**
Sumporna kiselina
- Izjave o opasnosti:**
H314 Causes severe skin burns and eye damage.
- Izjave o merama predostrožnosti:**
P260 Ne udisati prašinu/dim/gas/maglu/paru/raspršenu supstancu.
P303+P361+P353 AKO DOSPE NA KOŽU (ili kosu): Odmah svkinuti svu kontaminiranu odeću. Isprati kožu vodom/tušem.
P305+P351+P338 AKO DOSPE U OČI: Isprati oprezno vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako ih ima, liako je to lako izvesti. Nastaviti ispiranje.
P310 Pozvati odmah CENTA ZA RAD SA OTVROVIMA/lekara.
P405 Držati zaključano.
P501 Sadržaj/kontejner odlagati u skladu sa lokalnim/regionalnim/nacionalnim/međunarodnim propisima.

Attention:

Sredstva za negativnu kontrolu, sredstva za pozitivnu kontrolu, sredstva za kalibrisanje, konjugat, diluents za uzorak, diluents za probu i 20X koncentrovani puffer za pranje klasifikuju se kao Senzitivizatori kože 1.



- Reč koja označava simbol:**
Upozorenje
- Označavanje komponenti opasnosti:**
Reakciona masa 5-hloro-2-metil-4-izotiazolina-3-jedan [EC no. 247-500-7] i 2-metil-2H-izotiazola-3-jedan [EC br. 220-239-6] (3:1)
- Izjave o opasnosti:**
H317 Može izazvati alergijsku reakciju na koži.
- Izjave o merama predostrožnosti:**
P261 Izbegavati udisanje prašine/dima/gasa/magle/pare/raspršene materije.
P280 Nositi zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/štitnik za oči/štitnik za lice.
P321 Specifični tretman (vidi na ovoj nalepnici)
P333+P313 Iako se javi nadražaj kože ili osip: Potražite medicinsku pomoć/pregled.
P302+P352 AKO DOSPE NA KOŽU: Oprati sa dosta vode.
P501 Sadržaj/kontejner odlagati u skladu sa lokalnim/regionalnim/nacionalnim/međunarodnim propisima.

Za Liste sa podacima o bezbednosti pogledajte www.adaltis.net.

A. NAMENA

Imunoenzimski (ELISA) test četvrte generacije za određivanje antitela na virus hepatitisa C u humanom serumu i plazmi (EDTA, heparin i citrat). Test se može koristiti za skrining jedinica krvi na HCV-inficirane pacijenate.

Isključivo za "in vitro" dijagnostički upotrebu.

B. UVOD

Svetska zdravstvena organizacija (WHO) definiše hepatitis C infekcije na sledeći način:

Do otkrivanja uzročnog agensa 1989. god., hepatitis C, virusna infekcija jetre, je opisivana kao parenteralno prenosiv "ne A, ne B hepatitis". Otkrivanje i karakterizacija hepatitisa C virusa (HCV) doveli su do razumevanja njegove primarne uloge u post transfuzijskom hepatitisu i njegove sklonosti da prouzrokuje trajnu infekciju.

HCV je glavni uzročnik akutnog hepatitisa i hronične bolesti jetre, uključujući i cirozu i karcinom jetre. Globalno, procenjuje se da je oko 170 miliona osoba hronično zaraženo HCV-om i da je 3 do 4 miliona novoinficiranih osoba svake godine. HCV se prvenstveno prenosi direktnim kontaktom sa ljudskom krvlju. Glavni uzroci HCV infekcije širom sveta su korišćenje neproverenih transfuzija krvi, i ponovno korišćenje igala i špriceva koje nisu adekvatno sterilisane. Za sada nema vakcina za sprečavanje hepatitisa C, a lečenje hroničnog hepatitisa C je preskupo za većinu ljudi u zemljama u razvoju. Dakle, iz globalne perspektive, najveći uticaj na hepatitis C zdravstveni budžet verovatno će se postići fokusiranjem napora na smanjenju rizika od HCV infekcije pri intrahospitalnoj izloženosti (npr. transfuzija krvi, praksa nebezbedne injekcije) i rizičnom ponašanju (npr. ubrizgavanje droge).

Hepatitis C virus (HCV) je jedan od virusa (A, B, C, D i E), koji zajedno čine veliku većinu slučajeva virusnog hepatitisa. Hepatitis C virus (HCV) je RNA virus iz porodice flaviviridae, koji izgleda ima uzak spektar domaćina. Ljudi i šimpanze su jedine poznate vrste osetljive na infekcije, sa sličnim razvojem bolesti. Važna karakteristika virusa je relativna promenljivosti njegovog genoma, što je verovatno razlog velike sklonosti (80%) za hroničnu infekciju. HCV je klasifikovan u nekoliko različitih genotipova koji mogu biti važni u određivanju težine bolesti i odgovora na terapiju.

Period inkubacije HCV infekcije do pojave kliničkih simptoma kreće se od 15 do 150 dana. Kod akutnih infekcija, najčešći simptomi su umor i žutica, međutim, u većini slučajeva (između 60% i 70%), čak i oni koje razvijaju hroničnu infekciju, su simptomatski. Kod oko 80% novo zaraženih pacijenata dolazi do razvoja hronične infekcije. Ciroza se razvija kod 10% do 20% osoba sa hroničnom infekcijom, a karcinom jetre kod 1% do 5% osoba sa hroničnom infekcijom tokom perioda od 20 do 30 godine. Većina pacijenata koji boluju od karcinoma jetre, koji se nemaju hepatitis B infekciju, imaju dokaze o HCV infekciji. Mehanizmi kojim HCV infekcija dovodi do karcinoma jetre i dalje nije jasan.

Hepatitis C takođe povećava težinu osnovne bolesti jetre, kada koegzistira sa drugim hepatičnim stanjima. Konkretno, bolest jetre napreduje brže kod osoba sa alkoholnom bolesti jetre i HCV infekcijom. HCV se prvenstveno prenosi direktnim kontaktom sa ljudskom krvlju. Transmisija preko transfuzije krvi koja nije testirana na HCV infekciju, upotrebom neadekvatno sterilisanih igala, špriceva ili druge medicinske opreme, ili preko igle razmenjene između korisnika droge, dobro je dokumentovana. Seksualni i perinatalni prenos su takođe mogući, iako ređe. Mogući su i drugi oblici prenosa, kao što su društvene, kulturne, i običajne prakse koje koriste perkutanu proceduru (npr. pirsing uha i tela, obrezivanje, tetoviranje) ako se koristi nedovoljno sterilisana oprema. HCV se ne prenosi kijanjem, grljenjem, kašljem, hranom ili vodom, priborom za jelo ili slučajnim kontaktom.

U razvijenim i zemljama u razvoju, u visoko rizične grupe spadaju intravenski korisnici droga, primaoci nekontrolisane krvi, hemofiličari, pacijenti na dijalizi i osobe sa više seksualnih partnera koji se upuštaju u seks bez zaštite. Procenjuje se da u razvijenim zemljama 90% osoba sa hroničnom HCV infekcijom čine sadašnji i bivši intravenski korisnici droga i one sa istorijom nekontrolisane transfuzije krvi ili krvnih derivata. U mnogim zemljama u razvoju, gde se i dalje koriste nekontrolisana krv i krvni proizvodi, glavni načini prenosa su nesterilisana oprema za ubrizgavanje i nekontrolisana transfuzija krvi. Osim toga, ljudi koji koriste tradicionalno stvaranje ožiljaka i praksu obrezivanja su u opasnosti ukoliko koriste već korišćenu ili nesterilisanu opremu.

Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da je oko 170 miliona ljudi, 3% svetske populacije zaraženo HCV-om, i da postoji rizik od razvoja ciroze jetre i/ili karcinoma jetre. Prevalenca infekcije HCV u nekim zemljama Afrike, istočnog Mediterana, jugoistočne Azije i zapadnog Pacifika (kada su dostupni podaci) je visoka u poređenju sa nekim zemljama Severne Amerike i Evrope.

Dijagnostički testovi za HCV se koriste za sprečavanje infekcija kroz skrining donorske krvi i plazme, za postavljanje kliničke dijagnoze i donošenje bolje odluke u vezi sa medicinskom obradom pacijenta. Dijagnostički testovi komercijalno dostupni danas, zasnivaju se na imunoenzimskim testovima (EIA) za detekciju HCV specifičnih antitela. EIA može da otkrije više od 95% hronično zaraženih pacijenata, ali može da otkrije samo 50% do 70% akutnih infekcija. Rekombinantni imunoblot test (RIBA) koji identifikuje antitela koja reaguju sa individualnim HCV antigenima često se koristi kao dodatni test za potvrdu EIA pozitivnih rezultata. Testiranje HCV amplifikacijom RNK (npr. lančana reakcija polimeraze ili PCR, razgranat DNK test) se takođe koristi za potvrdu seroloških rezultata, kao i za procenu efikasnosti antivirusne terapije. Pozitivan rezultat ukazuje na prisustvo aktivne infekcije i potencijal za širenje infekcije i/ili za razvoj hronične bolesti jetre.

Antivirusni lekovi kao što je interferon uziman sam ili u kombinaciji sa ribavirinom, mogu da se koriste za lečenje osoba sa hroničnim hepatitisom C, ali je cena lečenja veoma visoka. Terapija interferonom efikasna je samo kod 10% do 20% pacijenata. Interferon u kombinaciji sa ribavirinom je efikasan kod 30% do 50% pacijenata. Izgleda da ribavirin korišćen samostalno nije efikasan.

Ne postoji vakcina za HCV. Istraživanje je u toku, ali visoka promenljivosti HCV genoma komplikuje razvoj vakcine. Nedostatak znanja o nekom zaštitnom imuno odgovoru posle HCV infekcije takođe otežava istraživanje u vezi vakcine. Nije poznato da li je imunološki sistem u stanju da eliminiše virus.

Neke studije, međutim, pokazuju prisustvo virus neutrališućih antitela kod bolesnika sa HCV infekcijom. U odsustvu vakcine, moraju se preduzeti sve mere predostrožnosti da se spreči infekcija uključujući (a) skrining i testiranje davalaca krvi i organa, (b) inaktivacija virusa u proizvodima dobijenih iz plazme (c) implementaciju i održavanje kontrole infekcije u praksi zdravstvene zaštite i pružanju nege, uključujući i odgovarajuću sterilizaciju medicinske i stomatološke opreme, (d) promovisanje promene ponašanja u javnosti i među zdravstvenim radnicima da se smanje prekomerne injekcije i da se koristi bezbedna praksa ubrizgavanja i (e) smanjenje rizika savetovanjem osoba sa visokim rizikom među korisnicima droga i seksualne prakse.

Genom kodira strukturne komponente, nukleokapsidni protein i dva glikoproteina omotača i funkcionalne sastojke koji su uključeni u replikaciju virusa i obradu proteina. Nukleokapsidni kodirani region izgleda najkonzervativniji među izolatima širom sveta.

C. PRINCIP TESTA

Mikroploče su obložene HCV-specifičnim antigenima dobijenim od "jezgra" i "ns" regiona kodiranih za konzervativne i imunodominantne antigenske determinante (peptid jezgra, rekombinantni NS3, NS4 i NS5 peptidi).

Čvrsta faza se prvo tretira sa razblaženim uzorkom i HCV Ab se vezuju, ako su prisutna, za antigene. Posle ispiranja svih ostalih komponenti iz uzorka, u 2. inkubaciji vezana HCV antitela, IgG i IgM, se detektuju dodavanjem poliklonalnih specifičnih anti hIgG & M antitela, označenih peroksidazom (HRP).

Enzim zarobljen na čvrstoj fazi, deluje na supstratnu TMB mešavinu, generišući optički signal koji je proporcionalan količini anti HCV antitela prisutnih u uzorku. Cut-off vrednost (granična vrednost) omogućava da se optičke gustine tumače na HCV antitela negativne i pozitivne rezultate.

D. KOMPONENTE

Komplet sadrži reagense za 96 testova (broj 071067), 192 testa (broj 071064) ili 480 testova (broj 071068).

Mikroplača	1
Negativna kontrola	1x4 mL/bočici
Pozitivna kontrola	1x2 mL/bočici
Kalibrator	2 bočice
Pufer za pranje 20x	1x50 mL/bočici
Konjugat	1x16 mL/bočici
Diluent za uzorke	1x50 mL/bočici
Supstrat TMB	1x16 mL/bočici
Stop rastvor	1x15 mL/bočici
Test diluent	1x8 mL/bočici
Folija za pokrivanje ploče	2
Broj testova	96
Broj	071067

Microplate	2
Negative Control	2x4 mL/bočici
Positive Control	1x4 mL/bočici
Calibrator	3 bočice
Wash Buffer Concentrate 20x	2x50 mL/bočici
Conjugate	2x16 mL/bočici
Sample Diluent	2x50 mL/bočici
Substrate TMB	2x16 mL/bočici
Stop Solution	2x15 mL/bočici
Assay Diluent	2x8 mL/bočici
Plate sealing foils	4
Broj testova	192
Broj	071064

Microplate	5
Negative Control	1x20 mL/bočici
Positive Control	1x10 mL/bočici
Calibrator	7 bočica
Wash Buffer Concentrate 20x	5x50 mL/bočici
Conjugate	2x40 mL/bočici
Sample Diluent	5x50 mL/bočici
Substrate TMB	2x40 mL/bočici
Stop Solution	2x40 mL/bočici
Assay Diluent	1x40 mL/bočici
Plate sealing foils	10
Broj testova	480
Broj	071068

1. Mikroploča

12 stripova sa 8 mikročasića obloženih peptidom jezgra, rekombinantnim NS3, NS4 i NS5 peptidima. Ploče su hermetički zatvorene u aluminijumskoj kesi sa desikantom. Dovedi mikroploču do sobne temperature (+18...24°C) pre otvaranja kese. Neupotrebljene stripove vratiti u aluminijumski omot sa desikantom, zatvoriti ga i čuvati na +2...8°C.

2. Negativna kontrola

Sprema za upotrebu. Sadrži 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1, 2% kazein kao proteinsku bazu i 0.1% Proclean 150 kao konzervans. Negativna kontrola je obojana maslinasto zeleno.

3. Pozitivna kontrola

Spreman za upotrebu. Sadrži 1% serumskih proteina koze, humana antitela na HCV, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azid i 0.1% Proclean 150 kao konzervans. Pozitivna kontrola je tamno zelene boje.

Važna napomena: *Nepostojanje održivih patogena u pozitivnoj kontroli ne može se u potpunosti obezbediti,*

zato, u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom, reagens treba tretirati kao potencijalno biohazardni.

4. Kalibrator

Liofilizovan. Rastvoriti ga količinom vode EIA kvaliteta datoj na etiketi. Sadrži fetalne goveđe serumske proteine, humana antitela na HCV čiji je sadržaj kalibrisan u odnosu na NIBSC radni standard broj 06/188-006, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1 , 0.3 mg/mL gentamicin sulfata i 0.1% Proclean 150 kao konzervanse.

Važna napomena: *Nepostojanje održivih patogena u kalibratoru se ne može u potpunosti obezbediti, zato, u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom, reagens treba tretirati kao potencijalno biohazardni.*

Napomena: *Zapremina koja jepotrebna da se rastvori sadržaj bočice može varirati od lota do lota. Molimo Vas da koristite zapreminu koja je naznačena na nalepnici.*

5. Koncentrat pufera za pranje 20x

20x koncentrovani rastvor. Razblažen, rastvor za pranje sadrži 10 mM fosfatni pufer pH 7.0 ± 0.2 , 0.05% Tween 20 i 0.05% Proclean 150.

Nakon rastvaranja, rastvor za pranje je stabilan 1 nedelju na $+2...8^{\circ}\text{C}$.

6. Konjugat

Spreman za korišćenje, crveno obojen rastvor. Sadrži peroksidazom rena konjugovana poliklonalna antitela koze na humani IgG i IgM, 5% BSA, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.4 ± 0.1 , 0.1% Proclean, i 0.05% Tween 20 kao konzervanse.

7. Supstrat TMB

Spreman za korišćenje. Sadrži 50 mM citrat-fosfatni pufer pH 3.5-3.8, 4% dimetilsulfoksida, 0.03% tetra-metil-benzidina ili TMB i 0.02% vodonik peroksida ili H_2O_2 . Pomešati lagano pre upotrebe.

Napomena: *čuvati zaštićen od svetlosti.*

8. Test diluent

Spreman za korišćenje. Sadrži serum koze, 10 mM Tris pufersani rastvor pH 8.0 ± 0.1 sa 0.1% Proclean 150 i 0.09% Na azida za predtretman uzoraka i kontrole na ploči, blokira smetnje.

9. Stop rastvor

Spreman za korišćenje.

Sadrži rastvor 0.3 M H_2SO_4 . Pomešajti lagano pre upotrebe.

10. Diluent za uzorke

Spreman za korišćenje, tamno zeleno obojen rastvor. Sadrži 1% kazeina, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1 i 0.1% Proclean 150 kao konzervans. Koristi se za razblaživanje uzoraka.

Napomena: *Diluent menja boju od maslinasto zelene do tamno plavkasto zelene u prisustvu uzorka.*

E. POTREBAN MATERIJAL KOJI SE NE DOBIJA

1. Kalibrisane mikropipete (200 μL i 10 μL) i nastavci za jednokratnu upotrebu.
2. Voda EIA kvaliteta (dvostruko destilovana ili dejonizovana voda, tretirana aktivnim ugljem da bi se uklonile oksidirajuće hemikalije koje se koriste kao dezinfekciona sredstva).
3. Laboratorijski sat za 60 minuta ili više.
4. Upijajući papir.
5. Kalibrisani ELISA mikrolejt termostatski inkubator podešen na $+37^{\circ}\text{C}$.
6. Kalibrisani ELISA mikrolejt čitač sa filtrima 450nm (čitanje) i ako je moguće sa 620-630nm (diferencijalni).
7. Kalibrisani ELISA mikrolejt vošer.
8. Vorteks ili sličan aparat za mešanje.

F. UPOZORENJA I MERE OPREZA

1. Test je namenjen kvalifikovanom i adekvatno obučenom tehničkom osoblju, pod nadzorom lekara odgovornog za laboratoriju. Ovo uputstvo se mora pažljivo pročitati pre upotrebe.
2. Pažljivo pročitati Listu podataka o bezbednosti (SDS) pre upotrebe proizvoda.
3. Kada se test koristi za skrining jedinica krvi i krvnih komponenti, mora da se koristi u sertifikovanoj i kvalifikovanoj laboratoriji od strane nacionalnih organa u toj oblasti (Ministarstva zdravlja ili sličnog subjekta) da sprovede ovu vrstu analize.
4. Svo osoblje uključeno u izvođenje testa mora da nosi zaštitnu odeću, rukavice bez talka i naočare. Izbegavati upotrebu bilo kakvih oštih predmeta (igla, nož). Svo osoblje treba da bude obučeno za biološke postupke, kao što je preporučeno od strane Centra za kontrolu bolesti, Atlanta, SAD i objavljeno u publikaciji Nacionalnog instituta za zdravlja: "Biosigurnost u mikrobiološkim i biomedicinskim laboratorijama", izd.1984.
5. Svo osoblje uključeno u rukovanje uzorcima treba da se vakciniše na NBV i HAV vakcinama koje su dostupne, bezbedne i delotvorne.
6. Laboratorija treba da se kontroliše kako bi se izbegli zagađivači kao što su prašina ili mikrobiološki agensasi iz vazduha prilikom otvaranja bočica sa reagensima i mikroploče i prilikom obavljanja testa. Zaštititi hromogen (TMB) od svetlosti i izbegavati vibracije radne površine, gde se test izvodi.
7. Po prijemu, čuvati komplet na $+2...8^{\circ}\text{C}$ u frižideru sa kontrolisanom temperaturom ili hladnoj sobi.
8. Ne zamenjivati komponente između test kompleta različitih lotova. Ne bi trebalo ni zamenjivati komponente iz dva kompleta istog lota.
9. Proverite da li su reagensi bistri i ne sadrže vidljive čestice ili agregate. Ako nisu, nadzornik laboratorije treba da pokrene neophodne procedure za zamenu kompleta.
10. Izbegavati unakrsne kontaminacije između serum / plazma uzoraka korišćenjem nastavaka za jednokratnu upotrebu i menjanjem posle svakog uzorka.
11. Izbegavati unakrsne kontaminacije između reagenasa u kompletu korišćenjem nastavaka za jednokratnu upotrebu i menjanjem posle svakog od njih.

12. Ne koristiti komplet nakon isteka roka naznačenog na spoljašnjem pakovanju i nalepnicama bočica.
13. Sve uzorke tretirati kao potencijalno infektivne. Svi uzorci humanog seruma treba da se tretiraju na nivou 2 biosigurnosti, prema preporuci Centra za kontrolu bolesti, Atlanta, SAD, objavljenoj u publikaciji Nacionalnog instituta za zdravlje: "Biosigurnost u mikrobiološkim i biomedicinskim laboratorijama", izd.1984.
14. Preporučuje se upotreba plastičnog posuđa za jednokratnu upotrebu za pripremu rastvora za pranje ili pri prenosu komponenti u druge kontejnere automatskih analizatora kako bi se izbegla kontaminacija.
15. Otpad nastao tokom upotrebe kompleta mora da bude odbačen u skladu sa nacionalnim direktivama i zakonima o laboratorijskom otpadu hemijskih i bioloških supstanci. Posebno se tečan otpad od pranja, ostaci kontrole i uzoraka moraju tretirati kao potencijalno infektivni materijal i inaktivirati pre odlaganja. Predložene procedure inaktivacije su tretman sa 10% hipohloritom (varikina) tokom 16-18 sati ili deaktivacije toplotom u autoklavu 20 minuta na 121°C.
16. Slučajna prosipanja moraju biti apsorbovana papirnim maramicama natopljenim hipohloritom, a zatim sa vodom. Papir zatim treba odbaciti u odgovarajući kontejner za laboratorijski / bolnički otpad.
17. Stop rastvor sadrži 0.3 M sumpornu kiselinu. Izbegavajte kontakt sa kožom i očima. U slučaju kontakta, odmah isprati sa velikom količinom vode.
18. Odložite rastvore reagenasa koji sadrže natrijum azid kao konzervans u skladu sa svim lokalnim, državnim i nacionalnim propisima. Nakon prosipanje reagenasa koji sadrže azide, pustiti veću količinu vode kako bi se isprao slivnik. Prosipanje raditi sa oprezom jer natrijumazid može da formira eksplozivna jedinjenja dužim kontaktom sa olovim ili bakarnim cevima.
19. Ne pušiti, jesti, piti ili primenjivati kozmetiku u prostoru u kojima se obrađuju uzorci ili koristi komplet reagenasa.
20. Ostalim otpadnim materijalom nastalim tokom korišćenja kompleta (npr: nastavci upotrebljeni za uzorke i kontrole, upotrebljen mikrolejt) treba rukovati kao potencijalno infektivnim i odložiti ih u skladu sa nacionalnim zakonima i direktivama o laboratorijskom otpadu.
21. Ne pipetirati ustima.

G. UZORCI: PRIPREMA I PREPORUKE

1. Krv se aseptično povlači venepunkcijom i priprema plazma ili serum standardnim tehnikama za pripremu uzoraka za kliničke laboratorijske analize. Nije od uticaja da li je plazma sa citratom, EDTA i heparinom.
2. Izbegavati dodavanje konzervanasa, posebno natrijum azida, jer će ove hemikalije uticati na enzimsku aktivnost konjugata, generišući lažne negativne rezultate.
3. Uzorci moraju da budu jasno identifikovani kodovima ili imenima, kako bi se izbeglo pogrešno tumačenje rezultata. Kada se komplet koristi za

skrining krvnih jedinica, preporučuje se označavanje bar kodom i elektronsko očitavanje.

4. Haemolizirani (crveni) i vidno hiperlipemični ("mlečni") uzorci moraju da budu odbačeni jer bi mogli da generišu lažne rezultate. Uzorci koji sadrže ostatke fibrina, teške čestice ili filamente i tela mikroba treba odbaciti, jer mogu da dovedu do pogrešnih rezultata.
5. Serum i plazma mogu se čuvati na temperaturi od +2...8°C u periodu do pet dana nakon prikupljanja. Za duže perioda skladištenja, uzorke treba zamrznuti i držati na -20°C tokom nekoliko meseci. Zamrznute uzorke ne bi trebalo ponovo zamrzavati/ odmrzavati jer to može generisati čestice koje mogu uticati na rezultat testa.
6. Ako su čestice prisutne, uzorak prečistiti centrifugiranjem 20 min na 2.000 obrtaja ili filteranjem kroz 0.2-0.8µm filter.

H. PRIPREMA KOMPONENATA I UPOZORENJA

Studija sprovedena na otvorenom kompletu pokazala je da nema nikakvih relevantnih gubitaka performansi nakon 1. ponovnog korišćenja i do 6 meseci nakon prvog otvaranja.

1. Mikroploče:

Pre otvaranja pakovanja ostaviti mikroploču da dostigne sobnu temperaturu (oko 1 h). Proverite da desikant nije postao tamno zelen, što ukazuje na defekt u proizvodnji. U ovom slučaju pozovite Adaltis-ov korisnički servis. Neiskorišćeni stripovi moraju da budu vraćeni u aluminijumsku vrećicu, zajedno sa isporučenim desikantom, istu dobro zatvoriti i čuvati na +2...8°C. Nakon prvog otvaranja, neupotrebljeni stripovi su stabilni dok boja indikatora vlažnosti unutar vrećice ne pređe od žute u zelenu.

2. Negativna kontrola:

Spremna za upotrebu. Dobro promešati na vorteksu pre upotrebe.

3. Pozitivna kontrola:

Spremna za upotrebu. Dobro promešati na vorteksu pre upotrebe. Sa kontrolom postupati kao sa potencijalno infektivnim materijalom.

4. Kalibrator:

Pažljivo rastvoriti liofilizovani sadržaj bočice sa količinom vode EIA kvaliteta datoj na nalepnici. Promešati na vorteksu pre upotrebe. Postupati kao sa potencijalno infektivnim materijalom.

Napomena: Rastvoreni kalibrator nije stabilan. Sačuvati zamrznute alikvote na -20°C.

5. 20x koncentrovan pufer za pranje (bočica od 50 mL):

Ceo sadržaj 20x koncentrovanog rastvora mora da se razblaži vodom EIA kvaliteta do 1000 mL (zapremina je data na nalepnici) i lagano promešati nakon pripreme i pre upotrebe. Kako neki kristali soli mogu biti prisutni u bočicu, voditi računa da se kompletan sadržaj rastvori prilikom pripreme rastvora. Tokom pripreme izbegavati stvaranje pene jer prisustvo mehurića može uticati na efikasnosti pranja.

Napomena: Razblažen, rastvor za pranje je stabilan 1 nedelju na +2...8°C.

6. Konjugat:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

Izbegavati kontaminaciju oksidacionim hemikalijama, prašinom i mikrobima. Ako rastvor treba da bude prenet, koristite samo plastične, i ako je moguće, sterilne kontejnere za jednokratnu upotrebu.

7. Supstrat TMB:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu. Izbegavati kontaminaciju oksidacionim hemikalijama, prašinom ili mikrobima. Ne izlažite ga jakom svetlu, oksidantima i metalnim površinama. Ako ova komponenta mora da se prenese koristi samo plastične, ako je moguće, sterilne kontejnere za jednokratnu upotrebu.

8. Test diluent:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

9. Stop rastvor:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

10. Diluent za uzorke

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

I. INSTRUMENTI I ALATI KOJI SE KORISTE U KOMBINACIJI SA TESTOM

1. Mikropipete moraju da budu kalibrisane kako bi se pipetirale korrektno zapremine po zahtevu testa i moraju se redovno dekontaminirati oni delovi koji bi mogli slučajno doći u kontakt sa uzorkom (alkoholom za domaćinstvo, 10% rastvorom izbeljivača, dezinfekcionim sredstvima za bolnice). One treba da se redovno održavaju kako bi imale preciznost od 1% i tačnost od $\pm 2\%$. Dekontaminacija prolivenih tečnosti ili ostataka komponenti iz kompleta treba da se vrši redovno.
2. ELISA inkubator treba da bude podešen na +37°C (tolerancija $\pm 0.5^\circ\text{C}$) i redovno proveravan da obezbedi ispravno održavanje temperature. Za inkubaciju su pogodna oba inkubatora, suvi inkubator i vodeno kupatilo, pod uslovom da su validni za inkubaciju ELISA testova.
3. ELISA vošer je izuzetno važan za sve performanse testa. Vošer mora biti pažljivo proveren i pravilno podešen. Obično je dovoljno 4-5 ciklusa pranja (aspiriranje + nalivanje rastvora za pranje 350 μL /časići = 1 ciklus) da se obezbede očekivane performanse testa. Preporučuje se vreme natapanja od 20-30 sekundi između ciklusa. Da bi ispravno podesili njihov broj, preporučuje se testiranje kontrolama i dobro karakterisanim negativnim i pozitivnim referentnim uzorcima, i proveru slaganja sa vrednostima prijavljenim ispod u odeljku O "Interna kontrola kvaliteta". Prema instrukcijama proizvođača redovno baždariti zapreminu nalivanja i održavati vošer (dekontaminacija i čišćenje igala).
4. Vremena inkubacije imaju toleranciju od +5%.

- ✓ Metoda sa kraćom inkubacijom (ili za 1. / 2. inkubaciju tolerancija je između 43 min i 47 min; za 3. inkubaciju tolerancija je između 14 i 16 min).
- ✓ Metoda sa standardnom inkubacijom (ili za 1. inkubaciju tolerancija je između 57 min i 63 min; za 2. i 3. inkubaciju tolerancija je između 29 i 31 min).

5. filtrom za čitanje 450nm i idealno sa drugim diferencijalnim filtrom (620 - 630nm). Njegove standardne performanse treba da budu (a) širina zraka svetlosti $\leq 10\text{ nm}$, (b) opseg apsorbance od 0 do ≥ 2.0 (c) linearnost ≥ 2.0 ; ponovljivost $\geq 1\%$. Nuliranje se vrši prema čašici A1 kao što je dato u odeljku "Test postupak". Optički sistem ridera mora redovno da se kalibriše u cilju pravilnog merenja optičke gustine. Rider treba redovno održavati prema uputstvima proizvođača.
6. Kada se koristi automatizovani ELISA sistem, svi kritični koraci (pipetiranje, inkubacija, pranje, čitanje, rukovanje podacima) moraju biti pažljivo postavljeni, kalibrisani, kontrolisani i redovno servisirani u cilju postizanja vrednosti datih u odeljku o "Unutrašnja kontrola kvaliteta". Test protokol mora da bude instaliran u operativnom sistemu jedinice i proveren kao i vošer i rider. Pored toga, deo stanice za distribuiranje rastvora (pipetiranje i pranje) mora biti validiran i pravilno podešen. Posebna pažnja mora se posvetiti izbegavanju prenošenja (carry over) iglama koje se koriste za pipetiranje uzoraka i za pranje. Ovo se mora pratiti i kontrolisati kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije susednih čašica zbog snažno reaktivnih uzoraka, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata. Upotreba ELISA automatskih sistema preporučuje se za skrining krvi i kada broj uzoraka koji se testira prelazi 20-30 u istom ciklusu.

L. KONTROLA I OPERACIJE PRE TESTIRANJA

1. Proverite rok važnosti kompleta odštampanog na spoljnoj nalepnici (primarni kontejner). Ne koristiti ako je istekao.
2. Proverite da tečne komponente nisu kontaminirane vidljivim česticama ili agregatima. Proverite da li je supstrat TMB rastvora bezbojan ili bledo plav aspiriranjem male količine sterilnom plastičnom pipetom. Proverite da tokom transporta nije došlo do loma ili curenja tečnosti u kutiji (primarni kontejner). Proverite da aluminijumska vrećica sa mikropločom nije probušena ili oštećena.
3. Rastvoriti sav sadržaj 20x koncentrovanog rastvora za pranje kao što je opisano.
4. Rastvoriti kalibrator kao što je opisano i lagano promešati.
5. Ostaviti sve ostale komponente da dostignu sobu temperaturu (oko 1 h), a zatim lagano promešati na vorteksu sve tečne reagense.
6. Postaviti ELISA inkubator na +37°C i pripremiti ELISA vošer punjenjem sa razblaženim rastvorom za pranje, u skladu sa uputstvima proizvođača. Podesiti potreban broj ciklusa pranja kao što se nalaze u odeljku I.3.
7. Proverite da li je ELISA čitač uključen ili obezbediti da bude uključen najmanje 20 minuta pre čitanja.

8. Ako koristite automatizovani ELISA sistem, uključiti ga, proverite podešavanja i budite sigurni da koristite pravi test protokol.
9. Proverite da li su mickopipete postavljene na potrebne zapremine.
10. Proverite da li je sva druga oprema na raspolaganju i spremna za upotrebu.
11. U slučaju problema, prekinuti sa radom i posavetovati se sa nadzornikom.

M. POSTUPAK TESTA

Test mora da se izvrši u skladu sa ovim uputstvom, vodeći računa da se održi isto vreme inkubacije za sve uzorke pri testiranju.

Test postupak može da se uradi sa dva vremena inkubacije. Izaberite onaj koji odgovara vašem propisu:

1. Standardna inkubacija (1. inkubacije 60 minuta, 2. i 3. inkubaciju 30 minuta)
2. Kratka inkubacija (1. i 2. inkubacija 45 minuta, 3. inkubacija 15 minuta)

1. Standardna inkubacija – manuelni postupak

1. Postavite potreban broj stripova na mikrolejt nosač. Ostavite čašicu A1 praznu za nuliranje aparata (slepa proba).
2. Pipetirajte 200 µL negativne kontrole u triplikatu, 200 µL kalibratora u duplikatu i jednom 200 µL pozitivne kontrole u odgovarajuće čašice. Ne rastvarati kontrole i kalibrator jer su spremni za upotrebu!
3. Dodajte 200 µL diluenta za uzorke u sve čašice za uzorke, a zatim pipetirajte 10 µL uzorka u svaku pravilno identifikovanu čašicu. Pomerati lagano ploču radi mešanja diluenta i uzorka, izbegavajući prelivanje i međusobno zagađenje susednih čašica.

Važna napomena: Proverite da li se boja diluenta za uzorke, nakon dodavanja uzoraka, menja od svetlo zelene do tamno plavo-zelene, što je potvrda da je uzorak zaista dodat.

4. Naliti 50 µL test diluenta u sve čašice sa kontrolama/ kalibratorom i uzorcima. Proverite da li je boja uzoraka tamno plava.
5. Inkubirati mikroploču **60 min na +37°C**.
Važna napomena: Stripovi moraju da budu pokriveni samolepljivom folijom iz pakovanja, samo kada se test obavlja ručno. Ne pokrivati stripove kada se koriste ELISA automatski aparati.
6. Oprati mikroploče na automatskom vošeru nalivanjem i aspiriranjem 350 µL/čašici razblaženog rastvora za pranje kao što je rečeno u odeljku I.3.
7. Pipetirajte 100 µL enzim konjugata u sve čašice osim u A1, slepu probu, i pokriti ih folijom. Proverite da li je ovaj crveno obojeni rastvor u svim čašicama, osim A1.

Važna napomena: Pazite da ne dodirujete unutrašnju plastičnu površinu vrhom nastavka pri pipetiranju enzim konjugata. Moguća kontaminacija.

8. Inkubirati mikroploču **30 min na +37°C**.
9. Oprati mikroploču kao što je rečeno u odeljku I.3.
10. Pipetirajte 100 µL supstratnog TMB rastvora u sve čašice, uključujući A1. Zatim inkubirati mikroploču na

sobnoj temperaturi (+18...24°C) u trajanju od **30 minuta**.

Važna napomena: Ne izlagati direktnom jakom svetlu.

11. Pipetirajte 100 µL stop rastvora u sve čašice da se zaustavi enzimska reakcija koristeći isti redosled pipetiranja kao u koraku 10. Dodatak stop rastvora će promeniti boju pozitivne kontrole i pozitivnih uzoraka od plave do žute.
12. Meriti intenzitet boje rastvora u svim čašicama, kao što je opisano u odeljku I.5, na 450nm (čitanje) i eventualno na 620-630nm (diferencijalni), nulirati instrument sa A1.

Važne napomene:

1. Ako drugi filter nije dostupan, pobrinite se da nema otisaka prstiju na dnu mikročašica pre čitanja na 450 nm. Otisci prstiju mogu da generišu pri čitanju lažno pozitivne rezultate.
2. Idealno je izvesti merenje odmah nakon dodavanja stop rastvora, ali svakako ne posle više od 20 minuta. Zbog oksidacije hromogena može da dođe do veće obojenosti.
3. Dokazano je da mešanje na 350 ± 150 O/min. tokom inkubacije povećava osetljivost testa za oko 20%.

2. Kratka inkubacija – manuelni postupak

1. Postavite potreban broj stripova na mikrolejt nosač. Ostavite čašicu A1 praznu za nuliranje aparata (slepa proba).
2. Pipetirajte 200 µL negativne kontrole u triplikatu, 200 µL kalibratora u duplikatu i jednom 200 µL pozitivne kontrole u odgovarajuće čašice. Ne rastvarati kontrole i kalibrator jer su spremni za upotrebu!
3. Dodajte 200 µL diluenta za uzorke u sve čašice za uzorke, a zatim pipetirajte 10 µL uzorka u svaku pravilno identifikovanu čašicu. Pomerati lagano ploču radi mešanja diluenta i uzorka, izbegavajući prelivanje i međusobno zagađenje susednih čašica.

Važna napomena: Proverite da li se boja diluenta za uzorke, nakon dodavanja uzoraka, menja od svetlo zelene do tamno plavo-zelene, što je potvrda da je uzorak zaista dodat.

4. Naliti 50 µL testa diluenta u sve čašice sa kontrolama/ kalibratorom i uzorcima. Proverite da li je boja uzoraka tamno plava.
5. Inkubirati mikroploču **45 min na +37°C**.
Važna napomena: Stripovi moraju da budu pokriveni samolepljivom folijom iz pakovanja, samo kada se test obavlja ručno. Ne pokrivati stripove kada se koriste ELISA automatski aparati.
6. Oprati mikroploče na automatskom vošeru nalivanjem i aspiriranjem 350 µL/čašici razblaženog rastvora za pranje kao što je rečeno u odeljku I.3.
7. Pipetirajte 100 µL enzim konjugata u sve čašice osim u A1, slepu probu, i pokriti ih folijom. Proverite da li je ovaj crveno obojeni rastvor u svim čašicama, osim A1.

Važna napomena: Pazite da ne dodirujete unutrašnju plastičnu površinu vrhom nastavka pri pipetiranju enzim konjugata. Moguća kontaminacija.

8. Inkubirati mikroploču **45 min na +37°C**.
9. Oprati mikroploču kao što je rečeno u odeljku I.3.
10. Pipete 100 µL supstratnog TMB rastvora u sve čašice, uključujući A1. Zatim inkubirati mikroploču na sobnoj temperaturi (+18...24°C) u trajanju od **15 minuta**.

Važna napomena: Ne izlagati direktnom jakom svetlu.

11. Pipete 100 µL stop rastvora u sve čašice da se zaustavi enzimska reakcija koristeći isti redosled pipetiranja kao u koraku 10. Dodatak stop rastvora će promeniti boju pozitivne kontrole i pozitivnih uzoraka od plave do žute.
12. Meriti intenzitet boje rastvora u svim čašicama, kao što je opisano u odeljku I.5, na 450 nm (čitavanje) i eventualno na 620-630 nm (diferencijalni), nulirati instrument sa A1.

Važne napomene:

1. *Ako drugi filter nije dostupan, pobrinite se da nema otisaka prstiju na dnu mikročašica pre čitanja na 450 nm. Otisci prstiju mogu da generišu pri čitanju lažno pozitivne rezultate.*
2. *Idealno je izvesti merenje odmah nakon dodavanja stop rastvora, ali svakako ne posle više od 20 minuta. Zbog oksidacije hromogena može da dođe do veće obojenosti.*
3. *Dokazano je da mešanje na 350 ± 150 O/min. tokom inkubacije povećava osetljivost testa za oko 20%.*

N. ŠEMA IZVOĐENJA TESTA

Metoda	Standardna inkubacija	Kratka inkubacija
Kontrole/ kalibrator	200 µL	200 µL
Diluent za uzorke & uzorci	200 µL diluenta + 10 µL uzorka	200 µL diluenta + 10 µL uzorka
Test diluent	50 µL	50 µL
Prva inkubacija	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Broj ciklusa pranja	4-5	4-5
Enzim konjugat	100 µL	100 µL
Druga inkubacija	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Broj ciklusa pranja	4-5	4-5
Supstrat TMB	100 µL	100 µL
Treća inkubacija	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatura	Sobna (+18...24°C)	Sobna (+18...24°C)
Stop rastvor	100 µL	100 µL
Čitanje OD	450/620 nm	450/620 nm

Primer šeme pipetiranja je dat u tabeli:

Mikroplejt		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2											
B	NC	S3											
C	NC	S4											
D	NC	S5											
E	CAL	S6											
F	CAL	S7											
G	PC	S8											
H	S1	S9											

Legenda: BLK = slepa proba NC = negativna kontrola
CAL = kalibrator PC = pozitivna kontrola S = uzorak

O. UNUTRAŠNJA KONTROLA KVALITETA

U bilo koje vreme tokom korišćenja testa izvoditi provere sa kontrolama / kalibratorom kako bi se proverilo da li se slažu očekivane OD450nm ili Co / S vrednosti date u tabeli.

Parametar	Zahtevi
Slepa proba	< 0.100 OD _{450/620nm}
Negativna kontrola (NC)	> 0.050 srednja OD _{450/620nm} vrednost nakon blankiranja
Kalibrator 10 mIU/mL (WHO)	S / Co > 1.1
Pozitivna kontrola	> 1.000 OD _{450/620nm}

Ako rezultati testa odgovaraju gore navedenim zahtevima, pređite na sledeći odeljak. Ako to nije, ne nastavljati dalje i uraditi sledeće provere:

Problems	Proveriti
Slepa proba > 0.100 OD _{450 nm}	1. da supstratni rastvor nije kontaminiran tokom testiranja.
Negativna kontrola (NC) > 0.050 OD _{450/620 nm} nakon blankiranja	1. da je proces pranja i podešenost vošera kao što je dato; 2. da je upotrebljen odgovarajući rastvor za pranje i da je vošer prethodno napunjen tim rastvorom; 3. da nije napravljena greška u postupku analize (nalivena pozitivna kontrola umesto negativne kontrole); 4. da nema kontaminacije negativne kontrole ili čašice gde je nalivena pozitivnim uzorkom, prelivanjem ili enzim konjugatom; 5. da mikropipete nisu kontaminirane pozitivnim uzorkom ili enzimom konjugatom 6. da igle za pranje nisu blokirane ili delimično zapušene.
Kalibrator S/Co < 1.1	1. da je postupak ispravno obavljen; 2. da nije greška nastala u njegovoj distribuciji (npr. nalivena negativna kontrola umesto kalibratora); 3. da je proces pranja i podešenost vošera kao što je potvrđeno u predkvalifikacionoj studiji; 4. da nije došlo do spoljne kontaminacije kalibratora.

Pozitivna kontrola < 1.000 OD ₄₅₀	1. da je postupak ispravno obavljen; 2. da nije greška nastala u raspodeli kontrole (npr.: naneta negativna kontrola, umesto pozitivne). U ovom slučaju, negativna kontrola će imati OD_{450nm} vrednost > 0.150, takođe; 3. da je proces pranja i podešenost vošera kao što je potvrđeno u predkvalifikacionoj studiji; 4. da nije došlo do spoljne kontaminacije pozitivne kontrole.
--	--

Ukoliko je došlo do bilo kog od gore navedenih problema, prijavite problem supervizoru radi daljeg delovanja.

P. REZULTATI

Rezultati testa se izračunavaju pomoću granične (cut-off) vrednosti utvrđene po sledećoj formuli:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{MNC} + 0.350$$

vrednosti nađene za test koriste se za tumačenje rezultata kao što je opisano u sledećem paragrafu.

Q. TUMAČENJE REZULTATA

Rezultati testa se tumače kao odnos OD_{450nm} uzorka i granične vrednosti (cut off) (ili S/Co) prema sledećoj tabeli:

S/Co	Interpretacija
< 0.9	Negativan
0.9 - 1.1	Ekvivokalan (sumnjiv, neodređen)
> 1.1	Pozitivan

Negativan rezultat ukazuje na to da pacijent nije zaražen sa HCV ili da jedinica krvi može biti upotrebljena za transfuziju.

Svaki pacijent sa ekvivokalnim rezultatom treba da se ponovo testira na drugom uzorku 1-2 nedelje nakon inicijalnog uzorka. Jedinica krvi ne može biti upotrebljena za transfuziju.

Pozitivan rezultat je indikacija HCV infekcije i u skladu sa tim treba postupati sa pacijentom. Jedinicu krvi treba baciti.

Važne napomene:

1. Tumačenje rezultata treba da se uradi pod nadzorom odgovorne osobe laboratorije da se smanji rizik od grešaka procene i pogrešnog tumačenja.
2. Svaki pozitivan rezultat treba da bude potvrđen alternativnim metodom koji može da otkrije IgG i IgM antitela (test potvrde) pre uspostavljanja dijagnoze virusnog hepatitisa.
3. Kao što je dokazano u performansama testa, test može da otkrije serokonverziju antitela na anti HCV jezgra ranije od nekih drugih komercijalnih testova. Zbog toga pozitivni rezultati, koji nisu potvrđeni sa ovim komercijalnim testovima ne moraju da budu isključeni kao lažno pozitivan rezultat! Uzorak mora u svakom slučaju da bude testiran potvrdnim testom.
4. Sve dok test može da otkrije i IgM antitela neki potpuno različiti rezultati sa drugim komercijalnim proizvodima za detekciju anti HCV antitela – u kojima nedostaje anti HgM konjugat u formulisanju enzima

tragača i time i IgM reaktivnosti - mogu da budu prisutni. Prava pozitivnost uzorka za antitela na HCV treba da bude potvrđena ispitivanjem i IgM reaktivnosti, važne za dijagnozu HCV infekcije.

5. Kada su rezultati testa prenose iz laboratorije do informatičkog centra, pažnja mora da se obrati da se izbegne pogrešan prenos podataka.
6. Dijagnozu infekcije virusnog hepatitisa mora da uradi i saopšti je pacijentu samo kvalifikovani lekar.

Dat je primer obračuna.

Sledeći podaci ne smeju da se koriste umesto rezultata dobijenih od strane korisnika.

Negativna kontrola: 0.019 - 0.020 - 0.021 OD_{450nm}

Srednja vrednost: 0.020 OD_{450nm}

Niže od 0.050 – Prihvaćeno

Pozitivna kontrola: 2.189 OD_{450nm}

Više od 1.000 – Prihvaćeno

Granična (Cut-off) vrednost = 0.020 + 0.350 = 0.370

Kalibrator: 0.550-0.530 OD_{450nm}

Srednja vrednost: 0.540 OD_{450nm} S/Co = 1.4

S/Co > 1.1 - Prihvaćeno

Uzorak 1: 0.070 OD_{450nm}

Uzorak 2: 1.690 OD_{450nm}

Uzorak 1 S/Co < 0.9 negativan

Uzorak 2 S/Co > 1.1 pozitivan

R. PERFORMANSE

Evaluacija performansi je sprovedena u skladu sa onim datim u Zajedničkim tehničkim specifikacijama (Common Technical Specifications ili CTS) (čl. 5, Poglavlje 3 IVD Direktive 98/79/EC) i sa obe inkubacije (standardna procedura i kratka).

1. GRANICA DETEKCIJE

Granica detekcije testa je izračunata korišćenjem postupka kratke inkubacije upotrebom britanskog radnog standarda za anti-HCV, kod NIBSC 06/188-006. U tabeli su date srednje vrednosti OD_{450nm} ovog standarda razblaženog negativnom plazmom pre testiranja.

Razblaženje	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Negativna plazma	0,25	0,20	0,20

Uz to testiran je "u celosti" uzorak kodiran Accurun 1 - serije 3000 – koji je isporučio Boston BIOMEDICA Inc, SAD, rezultati su dati u nastavku:

Accurun 1 serija	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. DIJAGNOSTIČKA SPECIFIČNOST I SENZITIVNOST

Procena rada testa sprovedena je ispitivanjem više od ukupno 5.000 uzoraka.

2.1 Dijagnostička specifičnost

Definiše se kao verovatnoća da test bude negativan u odsustvu specifičnog analita. Testirano je ukupno više od 5000 neizabranom donora, uključujući i donore po 1. put. Dijagnostička specifičnost je ocenjena u odnosu na test odobren od strane US FDA. Testiranjem 5043 davalaca krvi utvrđena je specifičnost 99.5%. 210 hospitalizovanih pacijenata testirano je na HCV Ab; nađena dijagnostički specifičnost je 99.5%. Uz to, dijagnostička specifičnost je procenjena testiranjem 162 potencijalno ometajuća uzorka (druge zarazne bolesti, pozitivni na E.coli antitela, pacijenti sa nevirusnim bolestima jetre, pacijenti na dijalizi, trudnice, hemolizirani, lipemični, itd). Vrednost specifičnosti je 100%. Nije primećena lažna reaktivnost zbog načina pripreme uzorka. Za određivanje specifičnosti korišćene su plazme, proizvedene različitim standardnim tehnikama (citrati, EDTA i heparin) i serum. Zamrznuti uzorci su takođe testirani kako bi se proverilo da li to ometa obavljanje testa. Nisu primećene nikakve smetnje.

2.2 Dijagnostička senzitivnost

Dijagnostička senzitivnost se definiše kao verovatnoća da test bude pozitivan u prisustvu specifičnog analita. Dijagnostička senzitivnost je eksterno utvrđena na ukupno 348 uzoraka; nađeno je da je dijagnostički senzitivnost 100%. Interno je testirano više od 50 drugih pozitivnih uzoraka, i opet je utvrđeno da je vrednost dijagnostičke senzitivnosti 100%. Takođe su testirani pozitivni uzorci infekcija različitih genotipova HCV. Osim toga ispitivana je većina dostupnih serokonverzionih panela iz BIOMEDICA Inc, Bostona, SAD, (PHV) i Zeptomatrik, SAD, (HCV).

Rezultati za neke od njih dati su u tabeli:

Panel	Br.uzoraka	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Napomena:

1. Detektovani pozitivni uzorci
2. HCV v.3.0

Konačno, proizvod je testiran na panelu EFS Ac HCV, lot 06.140817, dobijen od Etablissement Francais Du Sang (EFS), u Francuska, sa sledećim rezultatima:

EFS Panel Ac HCV

Uzorak	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Prosečna vrednost
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativan
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitivan
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitivan
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitivan
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitivan
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitivan

4. PRECIZNOST

Obračunata je na pet uzoraka, jedan negativan i četiri pozitivna testirana u 4 ponavljanja u šest odvojen ciklusa. Preciznost, dobijena za oba protokola, je ista. Rezultati su dati na sledeći način:

Intra-lot rezultati: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1.Lot (kratka inkubacija)

		Precision - %CV		
Uzorak	S/Co srednje	U istom ciklusu	Između ciklusa	Ukupno
Negativan	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitivni	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Intra-lot rezultati: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1.Lot (duža inkubacija)

		Preciznost - %CV		
Uzorak	S/Co srednje	U istom ciklusu	Između ciklusa	Ukupno
Negativan	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitivni	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Inter-lot rezultati: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1., 2. i 3. Lot (kratka inkubacija)

		Preciznost - %CV		
Uzorak	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
Negativan	8,65	8,29	6,13	
Kalibrator	4,98	4,44	5,38	
Pozitivan	4,11	3,11	1,37	

Varijabilnost prikazana u tabelama nije dovela do pogrešne klasifikacije uzorka.

S. PREDLOZI ZA REŠAVANJE PROBLEMA

Pridržavanje procedure testa i specifikacije, kao i pravilna upotreba reagenasa i pravilno pipetiranje, mogu pomoći da se izbegnu sledeće vrste grešaka:

Problem	Proveriti
OD veoma različita ($\pm 50\%$) od OD iz kontrole kvaliteta	- incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - Netačno doziranje količine reagenasa (predlog: proverite usaglašenost između pipetirane zapremine od strane pipete i one koju zahteva test; pre-kalibrisati pipete) - Netačna temperatura ili netačno vreme inkubacije (predlog: posvetiti veću pažnju održavanju inkubatora; zapisati početak inkubacije) - Greška u pranju ili u fotometarskom čitanju (predlog: proveriti rad ili podešenost odgovarajućih instrumenata) - Kontaminacija supstrata ili konjugata (predlog: koristi samo čiste plastične kontejnere za jednokratnu upotrebu)
Niska reproduktivnost rezultata	- Nekonstantna zapremina pri pipetiranju uzoraka ili reagenasa (predlog: proveriti preciznost pipeta i usaglašenost između pipetirane zapremine i one koju zahteva test, re-kalibrisati pipete) - Greška u pranju ili u fotometarskom čitanju (predlog: proveriti rada ili podešenost odgovarajućih instrumenata) - Kontaminacija supstrata ili konjugata (predlog: koristi samo čiste plastične kontejnere za jednokratnu upotrebu) - zagađenje ili degradacija reagensa (sugestija: koristiti odgovarajuće nastavke, za jednokratnu upotrebu i čiste plastične kontejnere za reagense i visoko kvalitetnu destilovanu vodu ili vodu ekvivalentnog kvaliteta).
Nema kolorimetrijske reakcija nakon dodavanja supstrata	- neki reagens nije pipetiran - jaka kontaminacija konjugata ili supstrata - greške u postupku izvođenja testa (npr. slučajno pipetiranje reagenasa u pogrešnom redosledu ili iz pogrešne bočice, itd)
Previše slaba reakcija (suviše niske OD)	- Vreme inkubacije prekratko, temperatura inkubacije suviše niska - netačno razblaživanje konjugata
Previše jaka reakcija (suviše visoke OD)	- netačno razblaživanje konjugata - suviše dugo vreme inkubacije, temperatura inkubacije suviše visoka - kvalitet vode za pripremu pufera za pranje nedovoljan (nizak stepen dejonizacije) - nedovoljno pranje (konjugat nije potpuno uklonjen)
Neobjašnjiva iskakanja	- kontaminacija pipeta, nastavaka ili kontejnere - nestabilno i nedovoljno pranje (konjugat nije pravilno uklonjen)
Previsok CV% u ciklusu	- Reagensi i / ili stripovi nisu prethodno zagrejani do sobne temperature pre upotrebe - plejt vošer ne pere pravilno (predlog: očistiti glavu za pranje)

Previsok CV% između ciklusa	- Uslovi inkubacije nisu konstantni (vreme, temperatura) - kontrole i uzorci nisu pipetirane u isto vreme (sa istim intervalima) (proverite redosled pipetiranja) - Lične varijacije u radu
-----------------------------	---

T. AUTOMATIZACIJA

Procedure date u ovom uputstvu za upotrebu su isključivo za ručno testiranje. Kada se koriste automatizovani instrumenati, poštovati procedure koje je dao proizvođač uređaja u uputstvu za rukovanje. Laboratorije moraju da prate svoje odobrene procedure validacije da dokažu kompatibilnost ovog proizvoda sa automatizovanim sistemom.

U. OGRANIČENJA

Procenjuje se da je udeo lažno pozitivnih rezultata, nepotvrđenih RIBA ili sličnim tehnikama, manji od 0.1% kod normalne populacije.

Primećeno je da zamrznuti uzorci koji sadrže fibrinske čestice ili agregate posle odmrzavanja generišu izvesne lažne rezultate.

BIBLIOGRAFIJA

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.



ElAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Paketin içindeki prospektüs, ürünü kullanmadan önce dikkatlice okunmalıdır.

Paketteki prospektüs dikkatle takip edilmelidir.

Pakette yer alan talimatlarından herhangi bir sapma olması halinde, tahlil sonuçlarının güvenilirliği garanti edilemez.



Üretici:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

www.adaltis.net

tr

ETİKETLERDE KULLANILAN SEMBOLLER

Türkçe TR							
	In Vitro Diagnostik Medikal Ürün	Katalog numarası	Lot Numarası	Dikkat, kullanım talimatlarına bakın	Sıcaklık sınırlaması	Tarafından Kullanılan	Test sayısı
	Üretici	Güneş ışığından uzak tutun	Üretim tarihi	Mikroplak	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Kalibratör
	Konjugat	Numune Dilüenti	Substrat TMB	Stop Solüsyonu (H ₂ SO ₄ 0,3 M)	Yıkama Bufer konsantre (20x)	Test Dilüenti	x mL ile sulandırma
	Biyolojik riskler	Tehlike	Uyarı				

Dikkat:

Stop Solüsyonu, Cilt Kor. 1A'ya gibi Cilt Kor. 1A



- Uyarı ifadesi:**
Tehlike
- Tehlikeyi belirleyici bileşenler için etiketlendirme:**
Sülfürik asit
- Tehlike Açıklamaları**
H314 Ciddi derecede deri yanıkları ve göz hasarına neden olur.
- Önlem Açıklamaları:**
P260 Tozu/dumanı/gazı/ buharı/asit buharını/püsküren maddeleri solumayın.
P361+P353 Cilt temasında(veya aç): Kontamine olan tüm giysileri derhal çıkarın. Cildi su / duş ile yıkayın.
P305+P351+P338 GÖZ TEMASINDA: Birkaç dakika su ile dikkatlice yıkayın. Varsa ve kolayca çıkarılabiliyorsa, kontakt lensleri çıkarın.
Durulamaya devam edin
P310 Hemen bir ZEHİR MERKEZİ'ne/ Doktor /..'a başvurun.
P405 Kilitli saklayın.
P501 İçindekileri Ulusal / bölgesel / yerel / uluslararası yönetmeliklere uygun olarak imha edin.

Dikkat:

Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol, Kalibratör, Konjugat, Numune Dilüenti, Test Dilüenti ve Yıkama Bufer Konsantresi 20X Cilt Hassasiyeti 1'e göre sınıflandırılmıştır.



- Uyarı ifadesi:**
Uyarı
- Tehlikeyi belirleyici bileşenler için etiketlendirme:**
Reaksiyon kümesi: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ve 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- Tehlike Açıklamaları**
H317 Allerjik deri reaksiyonuna neden olabilir.
- Önlem Açıklamaları:**
P261 Tozu / dumanı / gazı / sisi / buharı / spreyi solumayınız.
P280 Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruyucu/yüz koruyucusu kullanın.
P321 Özel işlem/tedavi (etikete bakın).
P333 + P313 Ciltte tahriş veya kızarıklık meydana gelirse: Tıbbi yardım/destek alın.
P302+P352 CİLT TEMASINDA: Bol su ile yıkayın.
P501 İçindekileri Ulusal / bölgesel / yerel / uluslararası yönetmeliklere uygun olarak imha edin.

Güvenlik Bilgi Formları için www.adaltis.net adresine bakın.

A. KULLANIM AMACI

İnsan plazmasında (EDTA, Heparin ve Sitrat) ve serumunda, Hepatit C Virüsüne karşı antikorların saptanması için Dördüncü Nesil Enzim İmmünoAsayay (ELISA). Kit, HCV enfekte hastaların kan ünitelerinin taranması için kullanılabilir.

Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.

B. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Hepatit C enfeksiyonunu şu şekilde tanımlar:

"Hepatit C, 1989'da nedensel maddenin tanımlanmasına kadar parenteral yoldan bulaşan" non-A, non-B hepatit "olarak anılan, bir karaciğer viral enfeksiyonudur. Hepatit C virüsünün (HCV) keşfi ve karakterizasyonu, transfüzyon sonrası hepatitteki ana rolünün ve devam eden enfeksiyonu tetikleme eğiliminin anlaşılmasına yol açtı.

HCV, siroz ve karaciğer kanseri de dahil olmak üzere akut hepatit ve kronik karaciğer hastalığının önemli nedenidir. Global olarak, tahminen 170 milyon kişi HCV ile kronik olarak enfektedir ve her yıl 3-4 milyon kişi ise yeni enfekte olmaktadır. HCV öncelikle, insan kanıyla doğrudan temas yoluyla yayılır. Dünya genelinde HCV enfeksiyonunun başlıca nedenleri, taramasız kan transfüzyonlarının kullanılması ve yeterince sterilize edilmemiş iğnelerin ve şırıngaların yeniden kullanılmasıdır. Hepatit C'yi önlemek için halihazırda herhangi bir aşı mevcut değildir ve gelişmekte olan ülkelerdeki çoğu kişinin alması gereken kronik hepatit C için tedavi maliyeti ise çok yüksektir. Bu nedenle, global perspektiften bakıldığında, hepatit C hastalığının üzerindeki en büyük etki, hastane kaynaklı maruziyetlerden HCV bulaşma riskini azaltmaya yönelik çabalara odaklanarak (örneğin, kan nakli, güvensiz enjeksiyon uygulamaları) ve yüksek riskli davranışlar giderilerek (örneğin; uyuşturucu/ilaç enjeksiyonu) elde edilecektir.

Hepatit C virüsü (HCV), viral hepatit vak'alarının büyük çoğunluğunu oluşturan virüslerden biridir (A, B, C, D ve E). Flaviviridae ailesinde dar bir konak aralığı olan, zarflı bir RNA virüsüdür. İnsanlar ve şempanzeler, enfeksiyona duyarlı bilinen türlerdir ve her iki türde de hastalık benzer şekilde geliştirmektedir. Virüsün önemli bir özelliği, genomunun göreceli olarak değişebilirliğidir ve bu da muhtemelen kronik enfeksiyonun uyarma eğiliminin (% 80) yüksek olması ile ilgilidir. HCV, hastalığın şiddetinin ve tedaviye verilen cevabın belirlenmesinde önemli olabilecek birkaç farklı genotipe kümelenmiştir.

Klinik semptomların başlamasından önceki HCV enfeksiyonunun kuluçka süresi, 15 ila 150 gün arasında değişir. Akut enfeksiyonlarda en sık görülen belirtiler yorgunluk ve sarılıktır; Bununla birlikte, vakaların çoğunluğunda (% 60 ila % 70 arasında), hatta kronik enfeksiyon gelişenler de semptomatiktir. Yeni enfekte olmuş hastaların yaklaşık % 80'inde kronik enfeksiyon gelişir. Siroz, kronik enfeksiyonu olan kişilerin yaklaşık % 10 ila % 20'sinde ortaya çıkar ve karaciğer kanseri, 20 ila 30 yıl arasında, kronik enfeksiyonu olan kişilerin % 1 ila %

5'inde gelişir. Hepatit B virüsü enfeksiyonu olmayan karaciğer kanseri hastalarının çoğunda HCV

enfeksiyonunun bulguları vardır. HCV enfeksiyonunun karaciğer kanserine yol açtığı mekanizmalar, hala belirsizdir. Hepatit C, diğer karaciğer rahatsızlıklarıyla bir arada bulunması durumunda, altta yatan karaciğer hastalığının ciddiyetini de artırır. Özellikle, karaciğer hastalığı, alkole bağlı karaciğer hastalığı ve HCV enfeksiyonu olan kişiler arasında daha hızlı ilerlemektedir. HCV öncelikle, insan kanıyla doğrudan temas yoluyla yayılır. HCV enfeksiyonu açısından taranmamış olan kan nakli yoluyla, sterilize edilmemiş iğnelerin, şırıngaların veya diğer tıbbi ekipmanların tekrar kullanılmasıyla veya uyuşturucu kullanıcıları arasında iğne paylaşımı yoluyla bulaşma belgelenmiştir. Daha az sıklıkta olmasına rağmen, cinsel ve perinatal bulaşma da görülebilir. Perkütan işlemler (örn., Kulak ve vücuda delme, sünnnet etme, dövme) kullanımı, sosyal, kültürel ve davranışsal uygulamalar gibi diğer bulaşma şekilleri, steril olmayan ekipman kullanıldığında ortaya çıkabilir. HCV hapşırma, sarılma, öksürme, yemek ya da su, yeme aletlerini paylaşma ya da sıradan temasla bulaşmaz.

Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, yüksek riskli gruplar, enjeksiyonla uyuşturucu kullananlar, taranmamış kan alıcısı, hemofili hastaları, diyaliz hastaları ve korunmasız cinsel ilişkide bulunan çok sayıda seks partnerine sahip kişilerdir. Gelişmiş ülkelerde, kronik HCV enfeksiyonu olan kişilerin % 90'ının, mevcut ve eski enjeksiyonla ilaç kullananların ve taranmamış kan veya kan ürünleri transfüzyon öyküsü olanların olduğu tahmin edilmektedir. Taranmamış kan ve kan ürünlerinin halen kullanıldığı birçok gelişmekte olan ülkede, en önemli bulaşma yolu, sterilize edilmemiş enjeksiyon ekipmanları ve taramasız kan transfüzyonlarıdır. Ayrıca, geleneksel skarifikasyon ve sünnnet yapılan insanlar da sterilize edilmemiş araçları kullandıklarında veya yeniden kullandıklarında risk altındadırlar.

WHO, dünya nüfusunun yaklaşık % 3'üne, 170 milyon kişiye HCV bulaştığını ve bunların karaciğer sirozu ve / veya karaciğer kanseri gelişme riski altında olduğunu tahmin etmektedir. Afrika, Doğu Akdeniz, Güneydoğu Asya ve Batı Pasifik'teki (prevalans verileri mevcut olduğunda) bazı ülkelerdeki HCV enfeksiyonunun prevalansı, Kuzey Amerika ve Avrupa'daki bazı ülkelerle karşılaştırıldığında daha yüksektir.

HCV için teşhis testleri, vericinin kan ve plazmasının taranması yoluyla enfeksiyonu önlemek, klinik tanıyı oluşturmak ve hastanın tıbbi tedavisi ile ilgili daha iyi kararlar almak için kullanılır. Günümüzde piyasada mevcut olan teşhis testleri, HCV'ye spesifik antikorların saptanması için Enzyme immünsorbent tahlili (EIA) esaslıdır. EIAs, kronik olarak enfekte hastaların % 95'inden fazlasını saptayabilir, ancak akut enfeksiyonların yalnızca % 50 ila % 70'ini tespit edebilir. Bireysel HCV antijenleriyle reaksiyona giren antikorları tanımlayan rekombinant immünoblot testi (RIBA), pozitif bir EIA sonunun doğrulanması için ek bir test olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Amplifikasyon testleri ile dolaşımdaki HCV için RNA test edilir (örn. Polimeraz zincir reaksiyonu veya PCR, dallı DNA tahlili), ayrıca antiviral tedavinin etkililiğini değerlendirmek adına,

serolojik sonuçların doğrulanması için de kullanılmaktadır. Pozitif sonuç, aktif enfeksiyon varlığına ve enfeksiyonun yayılmasına ve / veya kronik karaciğer hastalığının gelişmesine işaret etmektedir.

Tek başına veya ribavirin ile kombine edilen interferon gibi antiviral ilaçlar, kronik hepatit C'li kişilerin tedavisinde kullanılabilir, ancak tedavi maliyeti çok yüksektir. Tek başına uygulanan interferon tedavisi, hastaların yaklaşık% 10 ila% 20'sinde etkilidir. Ribavirin ile kombine edilen interferon tedavisi ise, hastaların yaklaşık% 30 ila% 50'sinde etkilidir. Ribavirin tek başına kullanıldığında etkili gibi gözükmemektedir.

HCV'ye karşı aşı yoktur. Araştırmalar devam etmekle beraber, HCV genomunun yüksek değişkenliği aşı gelişimini karmaşıktırmaktadır. HCV enfeksiyonunu takiben koruyucu bağışıklık tepkisinin bilinmemesi, aşı araştırmalarını da engeller. Bağışıklık sisteminin, virüsü ortadan kaldıracak yapıda olup olmadığı ise bilinmiyor.

Bununla birlikte, bazı çalışmalar HCV enfeksiyonu olan hastalarda, virüsü nötralize edici antikorların varlığını göstermiştir. Bir aşının olmayışı nedeniyle enfeksiyonu önlemeye yönelik tüm tedbirler alınmalıdır: (a) kan ve organ vericilerinin taranması ve test edilmesi; (b) Plazma türevi ürünlerinin virüs inaktivasyonu; (c) tıbbi ve diş hekimliğinin uygun şekilde sterilizasyonu da dahil olmak üzere, sağlık bakım yerlerinde enfeksiyon kontrol uygulamalarının uygulanması ve sürdürülmesi; (d) enjeksiyonların aşırı kullanımını azaltmak ve güvenli enjeksiyon uygulamalarını kullanmak için genel halk ve sağlık çalışanları arasında davranış değişikliğinin teşvik edilmesi; ve (e) Yüksek riskli uyuşturucu ve cinsel uygulamaları olan kişiler için risk azaltma danışmanlığı. “

Genom, yapısal bileşenleri, bir nucleocapsid proteini ve iki zarf glikoproteini ve virüs replikasyonu ve protein işleme ile ilgili işlevsel bileşenleri kodlar. Nükleokapsid kodlayan bölge, tüm dünyada elde edilen izolatlar arasında en muhafazakarı olarak görünmektedir.

C. TEST PRENSİBİ

Mikroplaklar, konzervatif ve immünodominant antijenik belirleyicileri (Çekirdek peptid, rekombinant NS3, NS4 ve NS5 peptidleri) kodlayan "çekirdek" ve "ns" bölgelerinden türetilen HCV'ye özgü antijenler ile kaplıdır.

Katı faz ilk olarak dilüe edilen numune ile muamele edilir ve eğer var ise HCV Ab, antijenleri tarafından yakalanır. Numunenin diğer tüm bileşenlerini yıkadıktan sonra, 2. inkübasyonda bağlanmış HCV antikorlarına, (hem IgG vehem de IgM'e), peroksidaz (HRP) ile işaretlenmiş poliklonal spesifik anti hlgG & M antikorlarının eklenmesiyle tespit edilir.

Substrat TMB karışımı üzerinde etkili olan katı fazda yakalanan enzim, numunede bulunan anti HCV antikorlarının miktarı ile orantılı olan bir optik sinyal üretir. Cut-off değeri, optik yoğunlukların HCV antikor negatif ve pozitif olan sonuçlarla yorumlanmasına olanak tanır.

D. BİLEŞENLER

Kit, 96 test (kod 071067), 192 test (kod 071064) veya 480 test (kod 071068) için gerekli olan reaktifleri içerir.

Mikroplak	1
Negatif Kontrol	1x4 mL/şişe
Pozitif Kontrol	1x2 mL/şişe
Kalibratör	2 şişe
Yıkama Bufer Konsantresi 20x	1x50 mL/şişe
Konjugat	1x16 mL/şişe
Numune Dilüenti	1x50 mL/şişe
Substrat TMB	1x16 mL/şişe
Stop Solüsyonu	1x15 mL/şişe
Assay Diluent	1x8 mL/şişe
Plak Kapatma Folyoları	2
Test sayısı	96
Kod	071067

Mikroplak	2
Negatif Kontrol	2x4 mL/şişe
Pozitif Kontrol	1x4 mL/şişe
Kalibratör	3 şişe
Yıkama Bufer Konsantresi 20x	2x50 mL/şişe
Konjugat	2x16 mL/şişe
Numune Dilüenti	2x50 mL/şişe
Substrat TMB	2x16 mL/şişe
Stop Solüsyonu	2x15 mL/şişe
Assay Diluent	2x8 mL/şişe
Plak Kapatma Folyoları	4
Test sayısı	192
Kod	071064

Mikroplak	5
Negatif Kontrol	1x20 mL/şişe
Pozitif Kontrol	1x10 mL/şişe
Kalibratör	7 şişe
Yıkama Bufer Konsantresi 20x	5x50 mL/şişe
Konjugat	2x40 mL/şişe
Numune Dilüenti	5x50 mL/şişe
Substrat TMB	2x40 mL/şişe
Stop Solüsyonu	2x40 mL/şişe
Assay Diluent	1x40 mL/şişe
Plak Kapatma Folyoları	10
Test sayısı	480
Kod	071068

1. Mikroplak

12 strip-8 mikrokuyucuklu; Çekirdek peptid, rekombinant NS3, NS4 ve NS5 peptidleri ile kaplı . Plaklar, kurutuculu alüminyum bir poşet içerisinde kapalı haldedir.

Poşeti açmadan önce, mikroplağın oda sıcaklığına (+18...24°C) ulaşmasını sağlayın (yaklaşık 1 saat). Kullanılmayan stripler içinde kurutucu olan poşetine konmalı, poşet sızdırmayacak şekilde kapatılmalı ve +2...8°C'ye geri koyulmalıdır.

2. Negatif Kontrol

Kullanıma hazır. 10 mM Na-sitrat tamponu pH 6.0 ± 0.1, protein bazlı % 2 kazein ve koruyucu olarak % 0.1 Proclin 150 içerir. Negatif kontrol, zeytin yeşili renk kodludur.

3. Pozitif Kontrol

Kullanıma hazır. % 1 keçi serum proteinleri, HCV pozitif insan antikorları, 10 mM Na-sitrat tamponu pH 6.0 ± 0.1, % 0.5 Tween 20, % 0.09 Na-azid ve koruyucu olarak %

0.1 Proclin 150 içerir. Pozitif kontrol, koyu yeşil renk kodludur.

Önemli not: Pozitif Kontrol'de canlı patojenlerin olmadığına dair tam olarak bir garanti verilemez, ve bu nedenle reaktif, iyi laboratuvar uygulamaları uyarınca potansiyel olarak biyolojik tehlikeye maruz kalmayacak şekilde ele alınmalıdır.

4. Kalibratör

Liyofilize kalibratör. Etiketle belirtilen EIA sınıfı su ile çözölmelidir. NIBSC Çalışma Standardı 06 / 188-006 kodunda , 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 0.3 mg / mL gentamisin sülfatta kalibre edilmiş fetus sığır serumu proteinleri, HCV insan antikorları ve koruyucu olarak% 0.1 Proclin 150 içerir.

Önemli not: Kalibratör'de canlı patojenlerin olmadığına dair tam olarak bir garanti verilemez, ve bu nedenle reaktif, iyi laboratuvar uygulamaları uyarınca potansiyel olarak biyolojik tehlikeye maruz kalmayacak şekilde ele alınmalıdır.

Not: Şişenin içeriğini çözmek için gereken hacim, lottan-lota değişebilir. Lütfen etiket üzerinde belirtilen doğru hacmi kullanın.

5. 20x Konsantre Solüsyon

20x konsantre solüsyon. Dilüe edilen wash solution (dilüe wash solution) 10 mM fosfat tamponu pH 7.0 ± 0.2,% 0.05 Tween 20 ve% 0.05 Proclin 150 içerir.

Dilüe edilmiş wash solüsyonu, +2...8°C'de 1 hafta stabildir.

6. Conjugate

Kullanıma hazır, kırmızı renk kodlu reaktif. İnsan IgG ve IgM'ine karşı Horseradish Peroxidase konjuge keçi poliklonal antikorları, %5 BSA, 10 mM Citrate buffer pH 6.4 ± 0.1, 0.1% Proclin ve koruyucu olarak, %0.005 Tween içerir.

7. Substrat TMB

Kullanıma hazır bileşen. 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine veya TMB ve 0.02% hydrogen peroxide veya H2O2 içerir. Kullanmadan önce iyice karıştırın.

Not: Güçlü ışığa duyarlı olduğundan, ışıktan korunaklı olarak saklanmalıdır.

8. Assay diluent

Kullanıma hazır bileşen. Plaktaki numunelerin, kontrollerin ve numunelerin etkileşimi bloklamak üzere ön işlem için %0.1 Proclin 150 ve %0.09 Na azide içeren 10 mM tris tamponlu solüsyon pH 8.0 ± 0.1, keç, serumu içerir.

9. Stop Solüsyonu

Kullanıma hazır bileşen.

0.3 M H₂SO₄ solusyonu içerir. Kullanımadan önce iyice karıştırın.

10. Sample Diluent

Kullanıma hazır reaktif, koyu yeşil kodlu reaktif.

% 1 casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1 ve koruyucu olarak %0.1 Proclin 150 içerir.

Numuneyi dilüe etmek için kullanılır.

Not: Dilüent, numunenin varlığında rengi, szeytin yeşilinden, koyu mavimsi yeşil renge dönüştürür.

E. GEREKEN AMA SAĞLANMAYAN MALZEMELER

1. Kalibre edilmiş Mikropipetler (200 µL ve 10 µL) ve tek kullanımlık plastik uçlar.
2. EIA sınıfı su (bidistile veya deiyonize, dezenfektanlar olarak kullanılan oksitleyici kimyasalları uzaklaştırmak için işlenmiş kömür).
3. 60 dakikalık veya daha yüksek olan zamanlayıcı (laboratuvar saati)
4. Kurutma kağıdı.
5. +37°C'lik sıcaklığa erişebilen, kalibre edilmiş termostatlı ELISA mikropak inkübatörü.
6. 450 nm (okuma) ve mümkünse 620-630 nm (blanking) filtrelili, kalibre edilmiş ELISA mikrokuyucu okuyucu.
7. Kalibre edilmiş ELISA mikropak yıkayıcı.
8. Vorteks ya da benzeri karıştırma araçları.

F. UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Kit, laboratuardan sorumlu bir tıp doktorunun gözetiminde, yalnızca nitelikli ve eğitilmiş teknik personel tarafından kullanılmalıdır. Paketin içindeki prospektüs, ürünü kullanmadan önce dikkatlice okunmalıdır.
2. Ürünü kullanmadan önce, Güvenlik Bilgi Formunu (SDS) dikkatlice okuyun.
3. Kit, kan birimlerinin ve kan bileşenlerinin taranması için kullanıldığında, bu tür analizleri gerçekleştirmek için o alandaki ulusal otorite tarafından sertifikalandırılmış, nitelikli bir laboratuarda (Sağlık Bakanlığı veya benzeri kuruluş) kullanılmalıdır.
4. Tahlili yapan tüm personel, koruyucu laboratuvar giysileri ve gözlüğü ile, pudrasız eldiven kullanmak zorundadır. Delici (iğne) veya kesici (bıçak veya benzeri) aletler kullanılmamalıdır. İlgili tüm personel, Atlanta, ABD Hastalık Kontrol Merkezi tarafından tavsiye edilen ve Ulusal Sağlık Enstitüsünün yayınında bildirilen biyogüvenlik prosedürleri konusunda eğitilmelidir: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Numuneler ile temas halindeki tüm personel HBV ve HAV için güvenli ve etkili olan aşılarla, aşılanmış olmalıdır.
6. Laboratuvar ortam, tüpleri - mikro plakları açarken ve testi çalışırken, toz veya havadan kaynaklanan mikrobiyal ajanlar gibi kontaminantları önleyecek şekilde kontrol edilmelidir. Substrate Solution (TMB)'ı kuvvetli ışıktan koruyun ve testin yapıldığı tezgahın titremesini/sallanmasını önleyin.
7. Teslim aldıktan sonra kiti +2...8°C'de sıcaklığı kontrol edilen bir buzdolabına veya soğuk odaya koyun.
8. Lotları farklı olan kit bileşenlerini birbirleriyle kullanmayın. Aynı lotlu kit bileşenlerin birbirleri arasında kullanılması önerilir.
9. Reaktiflerin berrak olup olmadığını ve görünür partikül veya agregalar içerip-içermediğini kontrol edin. Değilse, laboratuvar amirinden kitin değiştirilmesi için gerekli prosedürleri başlatmasını isteyin.
10. Tek kullanımlık pipet ucu kullanarak ve her numuneden sonra bunları değiştirerek serum / plazma numuneleri arasında çapraz kontaminasyonu engelleyin.

11. Tek kullanımlık pipet uçları kullanarak ve her birinin kullanımı arasında değiştirerek, kit reaktifleri arasındaki kontaminasyonu engelleyin.
12. Kiti, ambalajında ve şişe etiketlerinde son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
13. Tüm numuneleri, potansiyel bulaşıcı olarak ele alın. Tüm insan serum örnekleri, Atlanta Enstitüsü, Atlanta, ABD tarafından Sağlık Enstitüsünde yayınlanan bildiride belirtilenlere uygun olarak, Biyogüvenlik Seviyesi 2 olarak kullanılmalıdır. "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. Sıvı bileşenlerin hazırlanmasında veya bileşenlerin otomatik iş istasyonlarına aktarılmasında çapraz kontaminasyonu önlemek için, tek kullanımlık plastik malzeme kullanılması önerilir.
15. Kiti kullanımı sırasında çıkan atıklar, kimyasal ve biyolojik laboratuvar atıklarına ilişkin ulusal direktiflere ve kanunlara uygun olarak atılmalıdır. Özellikle, yıkama prosedüründen, kontrol ve numune kalıntılarından çıkan sıvı atıklara, potansiyel olarak enfektif materyal olarak muamele edilmeli ve atmadan önce inaktive edilmelidir. 16-18 saat boyunca % 10'luk r ev tipi çamaşır suyu ile muamele etmek ya da ısı inaktivasyonu için 121 ° C'de 20 dakika otoklavlama, önerilen inaktivasyon prosedürleridir.
16. Numunelerin ve işlem esnasındaki sıvıların kazara dökülmeler, kâğıt havlular ile adsorbe edilmelidir ve ardından çamaşır suyu ile temizlenmelidir. Temizlemede kullanılan tüm malzemeler (kâğıt havlular v.s.) kullanıldıktan sonra laboratuvar / hastane atığına uygun kaplarda atılmalıdır.
17. Stop solüsyonu 0.3 M sülfirik asit içerir. Cilt ve göz temasından kaçının. Temas halinde, derhal bol su ile yıkayın.
18. Koruyucu olarak Sodyum azid içeren reaktif solüsyonlarını, yerel, eyalet ve ulusal yönetmeliklere göre atın. Azid içeren reaktifleri atarken, bol miktarda su kullanarak yıkayın. Sodyum azid, kurşun veya bakır borular/tesisat ile uzun süre temas ettiğinde, patlayıcı bileşikler oluşturabileceğinden dikkatle atın.
19. Numunelerin veya kit reaktiflerinin çalışıldığı alanlarda sigara içmeyin, birşey yiyip-içmeyin veya kozmetik kullanmayın.
20. Kiti kullanımı nedeniyle oluşan diğer atık maddeler (örneğin: numuneler ve kontroller için kullanılan pipet uçları, kullanılan mikro plaalar) potansiyel enfeksiyöz olarak ele alınmalı ve bu laboratuvar atıklarıyla ilgili ulusal direktiflere ve kanunlara göre atılmalıdır.
21. Ağızınızla pipetleme yapmayınız.

G. NUMUNE: HAZIRLIK VE ÖNERİLER

1. Kan, venpunktür teknikleriyle aseptik koşullarda alınmalıdır. Numune (plazma veya serum), klinik laboratuvar analizlerinde kullanılmak üzere standart teknikler kullanılarak hazırlanmalıdır. Numunenin sitrat, EDTA ve heparin ile hazırlanmasında herhangi bir etki/sorun gözlenmemiştir.
2. Numunelere koruyucu maddeler eklemeyin; özellikle de sodyum azid konjugatın enzimatik aktivitesini etkileyerek yanlış negatif sonuçlar çıkmasına neden olur.
3. Sonuçların yanlış yorumlanmasını önlemek için, numunelerin kodlarla veya isimlerle açıkça

tanımlanması gerekir. Kit, kan ünitelerinin taranması için kullanıldığında, barkod etiketleme ve elektronik okuma önerilir.

4. Hemolizli (kırmızı) ve görünür şekilde hiperlipemik ("sütlümsü") numuneler, yanlış sonuçlar üretebileceği için atılmalıdır. Fibrin veya ağır partiküllerin veya mikrobiyal filamentlerin ve cisimlerin kalıntılarını içeren numuneler de yanlış sonuçlara neden olabilecekleri için atılmalıdır.
5. Serum ve plazma, toplandıktan sonra beş gün süreyle +2...8°C'de saklanabilir. Daha uzun depolama süreleri için, numuneler birkaç ay boyunca -20°C'de dondurularak depolanabilir. Dondurulmuş olan numune, birden fazla kez dondurulmamalı / çözülmemelidir; bu işlem, test sonucunu etkileyebilecek partiküller oluşturabilir.
6. Partikül varsa numuneyi, 2.000 devirde 20 dakika santrifüjleyin veya 0.2-0.8u filtre kullanarak filtreleyin.

H. BİLEŞENLERİN HAZIRLANMASI VE UYARILAR

Açılmış bir kit üzerinde yapılan bir araştırma, ürünün 1 kez daha tekrar kullanılmasına kadar, 6 ay süreyle herhangi bir aktivite kaybı olmadığını göstermiştir.

1. Mikroplaklar:

Poşeti açmadan önce, mikroplağın oda sıcaklığına ulaşmasını sağlayın (yaklaşık 1 saat). Kurutucu maddenin koyu yeşil renge dönüşmediğinden emin olun; bu üretimde bir hata olduğunu gösterir. Böyle bir durumda, Adaltis müşteri servisini arayın.

Kullanılmayan stripler, içinde kurutucusu olan alüminyum poşetinin içerisine koyulmalı ve sıkıca kapatılarak +2...8°C'de saklanmalıdır. Poşeti bir kez açtıktan (ilk açılış) sonra kalan stripler, poşetteki koruyucunun göstergesi sarıdan yeşile dönene kadar stabildir.

2. Negatif Kontrol:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

3. Pozitif Kontrol:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın. Bu bileşen, potansiyel enfeksiyöz olarak ele alınmalıdır.

4. Kalibratör

Liyofilize şişenin içeriğini, etiketinde belirtilen EIA dereceli su miktarı ile dikkatlice çözün. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

Bu bileşen, potansiyel enfeksiyöz olarak ele alınmalıdır. **Not:** Kalibratör çözündüğünde stabil değildir. -20 ° C'de porsiyonlanmış halde saklayın.

5. 20x Konsantre Solüsyon (50 mL):

20x konsantre solüsyonun tüm içeriği, 1000 mL'ye kadar (hacim, etikette belirtilmektedir) EIA dereceli su ile dilüe etmeli ve kullanmadan önce hafifçe ters-yüz ederek karıştırılmalıdır. Şişede bazı tuz kristalleri olabilir, bu yüzden solüsyonu hazırlarken tüm içeriği çözmeye özen gösterin. Hazırlama esnasındaki kabarcık oluşumu, yıkama döngülerinin verimliliğini etkileyebileceğinden köpürmeden kaçının.

Not: Dilüe edilmiş wash solüsyonu, +2...8°C'de 1 hafta stabildir.

6. Conjugate:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

Sıvıyı oksitleyici kimyasal maddeler, havadaki toz veya mikroplarla oluşabilecek kontaminasyon engellenmelidir. Bu bileşenin transferinde sadece plastik, mümkünse steril tek kullanımlık kaplar kullanılmalıdır.

7. Substrat TMB:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

Oksitleyici kimyasal maddeler içeren sıvı, havadaki toz veya mikroplarla oluşabilecek kontaminasyon engellenmelidir. Güçlü aydınlatmaya, oksitleyici maddelere ve metalik yüzeylere maruz bırakmayın. Bu bileşenin transferinde sadece plastik, mümkünse steril tek kullanımlık kaplar kullanılmalıdır.

8. Assay Diluent:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

9. Stop Solüsyonu:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

10. Sample Diluent:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

I. KİTLE BİRLİKTE KULLANILAN ENSTRÜMANLAR VE ARAÇLAR

1. Mikropipetler, tahlilin gerektirdiği doğru hacmi sağlamak kalibre edilmelidir ve yanlışlıkla numune veya kitin bileşenleri ile temas edebilecek bu parçalar düzenli olarak dekontamine (ev tipi alkol, çamaşırsuyu % 10, hastane sınıfı dezenfektanlar ile) edilmelidir. Ayrıca, % 1'lik hassasiyet ve % ± 2 'lik doğrulukla çalışabilmeleri için düzenli olarak bakımları yapılmalıdır. Döküntülerin veya kit bileşenlerinin kalıntılarının dekontaminasyon işlemi, düzenli olarak yapılmalıdır.
2. ELISA inkübatör cihazı + 37 ° C'ye (tolerans ± 0.5 ° C) ayarlanmalıdır ve doğru sıcaklığın muhafaza edildiğinden emin olmak için düzenli olarak kontrol edilmelidir. ELISA testlerinin inkübasyonu için, cihazın onaylanmış olması koşulu ile, kuru inkübatörler ve su banyoları inkübasyon için uygundur.
3. ELISA yıkayıcı, tahlilin genel performansı için son derece önemlidir. Yıkayıcı onaylanmış ve doğru bir şekilde optimize edilmiş olmalıdır. Genellikle 4-5 yıkama döngüsü (aspirasyon + 350 μ L / kuyucuk yıkama solüsyonu = 1 devir) tahlilin beklendiği gibi yapıldığından emin olmak için yeterlidir. Döngüler arasında 20-30 saniyelik ıslatma süresi önerilir. Numaralarını doğru bir şekilde ayarlamak için, kontrolleri / kalibratör ve negatif ve pozitif referans numuneleri ile testin yapılmasını ve aşağıdaki "İnternal Kalite Kontrolü" bölümlerinde belirtilen değerlerin eşleşmesini kontrol etmeniz öneririz. Dağıtılan hacimlerin kalibrasyonu ve yıkayıcının bakımı (iğnelerin dekontaminasyonu ve temizlenmesi) imalatçının talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

4. Inkübasyon süreleri ± 5 %'lik toleransa sahiptir.

- ✓ Kısa Inkübasyon Metodu (43 dakika ile 47 dakika arasında birinci ve ikinci inkübasyon toleransı, 14 ile 16 dakika arası üçüncü inkübasyon toleransı).
- ✓ Standart Inkübasyon Metodu (57 dakika ile 63 dakika arasında 1. inkübasyon toleransı, 29 ve 31 dakika arasındaki ikinci ve üçüncü inkübasyon toleransı).

5. ELISA mikropipet okuyucusunda, 450nm'lik okuma filtresi ve kör işlemi için ikinci bir filtre (620-630nm) olmalıdır. Standart performansların (a) bant genişliği ≤ 10 nm olmalıdır; (b) 0'dan ≥ 2.0 'a kadar absorbans aralığı; (c) doğruluk ≥ 2.0 ; tekrarlanabilirlik $\geq 1\%$ olmalıdır. Kör işlemi (blanking), "Test Prosedürü" bölümünde tarif edildiği gibi yapılır. Okuyucunun optik sistemi, doğru optik yoğunluğun ölçülmesini sağlamak için düzenli olarak kalibre edilmelidir. Üreticisinin talimatlarına göre muhafaza edilmelidir.
6. ELISA otomatik çalışma cihazı kullanırken, tüm kritik adımlar (bakım, inkübasyon, yıkama, okuma, çalkalama, veri işleme) Bölüm O "İç Kalite" de yazılı olan değerlerle eşleşecek şekilde dikkatlice ayarlanmalı, kalibre ve kontrol edilmeli ve düzenli olarak servise hizmeti alınmalıdır. Test protokolü ünitenin işletim sistemine yüklenmeli ve yıkayıcı ve okuyucu valide edilmelidir. Ayrıca, cihazın sıvı çalışma kısmı (dağıtım ve yıkama) doğrulanmalı ve doğru bir şekilde ayarlanmalıdır. Numunelerin dağıtılması ve yıkanması için kullanılan iğnelerin tıkalı/kirli olup olmadığına özellikle dikkat edilmelidir. Hatalı sonuçlara yol açan kuvvetli reaktif numunelerden dolayı, komşu kuyucuklarda kontaminasyon olasılığını en aza indirmek için kontrol edilmelidir. Kan taramaları için ve test edilecek numune sayısı işlem başına 20-30 üniteyi aştığında, otomatik ELISA analizörlerinin kullanılması tavsiye edilir.

II. TAHLİL ÖNCESİ KONTROLLER VE İŞLEMLER

1. Kit kutusunun dış etiketi üzerine basılan kitin son kullanma tarihini kontrol edin. Kullanım süresi bitmişse, kullanmayın.
2. Sıvı bileşenlerin çıplak gözle görülebilir parçacıklar veya agregatlar tarafından kontamine olmadığını kontrol edin. Steril şeffaf bir plastik pipetle küçük bir hacim aspire ederek Substrat Solüsyonunun renksiz veya soluk mavi olup olmadığını kontrol edin. Nakliye esnasında kırılma olmadığından ve kutunun içinde sıvı döküldüğünden emin olun. Mikropipet içeren alüminyum poşetin delinmediğinden veya hasar görmediğinden emin olun.
3. 20x konsantre Wash Buffer'ın tüm içeriğini yukarıda açıklandığı gibi dilüe edin.
4. Kalibratörü yukarıda anlatıldığı gibi çözün.
5. Diğer tüm bileşenlerin oda sıcaklığına ulaşmasını sağlayın (yaklaşık 1 saat boyunca) ve daha sonra açıklandığı gibi karıştırın.
6. ELISA inkübatörünü + 37°C'ye ayarlayın ve üreticinin talimatlarına göre dilüe edilen yıkama solüsyonuyla çalkalayarak, ELISA yıkayıcıyı hazırlayın. Doğru yıkama döngüsü sayısını, Bölüm I.3'te bulabilirsiniz.
7. Okumadan önce ELISA okuyucusunun en az 20 dakikadır açık olduğunu kontrol edin.

8. Otomatik cihaz kullanıyorsanız, cihazı açın, ayarları kontrol edin ve doğru test protokolünü kullandığınızdan emin olun.
9. Mikropipetlerin gerekli hacme ayarlandığını kontrol edin.
10. Diğer tüm ekipmanın hazır ve kullanıma hazır olup olmadığını kontrol edin.
11. Sorun olması durumunda, testi devam ettirmeyin ve amirinize danışın.

M. TEST PROSEDÜRÜ

Test, test edilen tüm numuneler için aynı inkübasyon süresinin aynı olduğuna dikkat ederek, aşağıda belirtilenlere göre gerçekleştirilmelidir.

Test Prosedürü, iki kez inkübasyon prosedürüyle de yapılabilir. Ayarlamamız gereken bir tanesini seçin:

1. Standard Inkübasyon (1. inkübasyon 60 dk, 2. ve 3. inkübasyon 30 dk)
2. Kısa Inkübasyon (1. ve 2. inkübasyon 45 dk, 3. inkübasyon 15 dk)

1. Standard Inkübasyon- Manual tahlil:

1. Mikrokuyucuk taşıyıcısına, gereken sayıda mikrokuyucuk yerleştirin. 1. Kuyucuğu kör için boş bırakın.
2. Üç kuyucuğa 200 µL Negative Control, iki kuyucuğa 200 µL Calibrator ve bir kuyucuğa 200 µL Positive Control pipetleyin. Kontrol ve Kalibratörleri kullanıma hazırdır, dilüe etmeyin !
3. Tüm numune kuyucuklarına 200 µL Sample Diluent pipetleyinin; uygun ve tanımlanmış kuyucuklara 10 µL numune pipetleyin. Numunenin dilüentle tamamen karışmasını sağlamak için plağı yavaşça karıştırın; ancak kuyucuklar arasında herhangi bir geçiş ya da sıçrama olmasına izin vermeyin.

Important note: Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Tüm kalibratör, kontrol ve numune kuyucuklarına 50 µL Assay Diluent pipetleyin. Numune kuyucuklarının renginin koyu maviye dönüştüğünü kontrol edin.
5. Mikroplağı **60 dk, +37°C**'de inkübe edin.
Önemli not: Stripler, sağlanan yapışkan sızdırmayan folyo ile sıkıca kapatılmalıdır(sadece testi manuel yapıyorsanız). Otomatik ELISA cihazı kullanıyorsanız, stripleri kapatmayın.
6. Mikroplağı otomatik yıkayıcıyla, Bölüm I.3'te belirtildiği gibi, 350 µL / kuyucuk olacak şekilde dilüe wash buffer koyup ve aspirasyon yaparak yıkayın.
7. Tüm kuyucuklara (kör kuyucuğu olan 1. Kuyucuk hariç) 100 µL Enzyme Conjugate pipetleyin. Tüm kuyucuklara (A1 hariç) kırmızı enkli bileşenin pipetlenmiş olduğunu kontrol edin.

Önemli not: Kuyucuğun plastik iç yüzeyine, Enzyme Konjugatlı pipet ucu ile dokunmamaya özen gösterin. Kontaminasyon oluşabilir.

8. Mikroplağı **30 dk, +37°C**'de inkübe edin.
9. Kuyucukları Bölüm I.3 te anlatıldığı gibi yıkayın.
10. Kör de dahil olmak üzere tüm kuyucuklara, 100 µL

Substrate TMB karışımı pipetleyin. Sonra, mikroplağı oda sıcaklığında (+18...24°C), **30 dk** inkübe edin.

Önemli not: Güçlü doğrudan aydınlatmaya maruz bırakmayın. Yüksek arka plan oluşabilir.

11. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için adım 10'daki ile aynı pipetleme düzenini kullanarak tüm kuyucuklara 100 µL Stop Solution pipetleyin. Stop solüsyonunun eklenmesi ile pozitif kontrol ve pozitif numuneler maviden sarıya döner.
12. 450 nm (okuma) ve mümkünse 620-630 nm'de (arka planı çıkarma), bölüm I.5'te açıklandığı gibi, solüsyonun renk yoğunluğunu ölçün (A1 kör).

Önemli notlar:

1. İkinci filtre mevcut değilse, 450nm'de okumadan önce, mikrokuyucuğun alt kısmında parmak izi olmadığından emin olun. Parmak izi, okumada yanlış pozitif sonuçlar doğurabilir.
2. Okuma işlemi, Stop solüsyonunun eklenmesinden hemen sonra, en fazla 20 dakika sonra yapılmalıdır. Yüzeyde kendiliğinden oluşan oksidasyon, daha yüksek bir dara absorbansına neden olabilir.
3. Inkübasyon sırasında 350 ± 150 rpm'de sallanmanın, tahlilin hassasiyetini yaklaşık% 20 arttırdığı kanıtlanmıştır.

2. Kısa Inkübasyon- Manual tahlil:

1. Mikrokuyucuk taşıyıcısına, gereken sayıda mikrokuyucuk yerleştirin. 1. Kuyucuğu kör için boş bırakın.
2. Üç kuyucuğa 200 µL Negative Control, iki kuyucuğa 200 µL Calibrator ve bir kuyucuğa 200 µL Positive Control pipetleyin. Kontrol ve Kalibratörleri kullanıma hazırdır, **dilüe etmeyin !**
3. Tüm numune kuyucuklarına 200 µL Sample Diluent pipetleyinin; uygun ve tanımlanmış kuyucuklara 10 µL numune pipetleyin. Numunenin dilüentle tamamen karışmasını sağlamak için plağı yavaşça karıştırın; ancak kuyucuklar arasında herhangi bir geçiş ya da sıçrama olmasına izin vermeyin.

Önemli not: Numunenin eklenmesiyle Sample Diluentinin renginin, açık yeşilden koyu mavimsi yeşil renge dönüşüp-dönüşmediğini kontrol edin, numune gerçekten eklendiyse bu dönüşüm olur.

4. Tüm kalibratör, kontrol ve numune kuyucuklarına 50 µL Assay Diluent pipetleyin. Numune kuyucuklarının renginin koyu maviye dönüştüğünü kontrol edin.
5. Mikroplağı **45 dk, +37°C**'de inkübe edin.
Önemli not: Stripler, sağlanan yapışkan sızdırmayan folyo ile sıkıca kapatılmalıdır(sadece testi manuel yapıyorsanız). Otomatik ELISA cihazı kullanıyorsanız, stripleri kapatmayın.
6. Mikroplağı otomatik yıkayıcıyla , Bölüm I.3'te belirtildiği gibi, 350 µL / kuyucuk olacak şekilde dilüe wash buffer koyup ve aspirasyon yaparak yıkayın.
7. Tüm kuyucuklara (kör kuyucuğu olan 1. Kuyucuk hariç) 100 µL Enzyme Conjugate pipetleyin. Tüm kuyucuklara (A1 hariç) kırmızı enkli bileşenin pipetlenmiş olduğunu kontrol edin.

Önemli not: Kuyucuğun plastik iç yüzeyine, Enzyme Konjugatlı pipet ucu ile dokunmamaya özen gösterin. Kontaminasyon oluşabilir.

8. Mikroplağı **45 dk, +37°C**'de inkübe edin.
9. Kuyucukları Bölüm 1.3 te anlatıldığı gibi yıkayın.
10. Kör de dahil olmak üzere tüm kuyucuklara, 100 µL Substrate TMB karışımı pipetleyin. Sonra, mikroplağı oda sıcaklığında (+18...24°C), **15 dk** inkübe edin.

Önemli not: Güçlü, doğrudan aydınlatmaya maruz bırakmayın. Yüksek arka plan oluşabilir.

11. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için adım 10'daki ile aynı pipetleme düzenini kullanarak tüm kuyucuklara 100 µL Stop Solution pipetleyin. Stop solüsyonunun eklenmesi ile pozitif kontrol ve pozitif numuneler maviden sarıya döner.
12. 450 nm (okuma) ve mümkünse 620-630 nm'de (arka planı çıkarma), bölüm 1.5'te açıklandığı gibi, solüsyonun renk yoğunluğunu ölçün (A1 kör).

Önemli notlar:

1. İkinci filtre mevcut değilse, 450nm'de okumadan önce, mikrokuyucuğun alt kısmında parmak izi olmadığından emin olun. Parmak izi, okumada yanlış pozitif sonuçlar doğurabilir.
2. Okuma işlemi, Stop solüsyonunun eklenmesinden hemen sonra, en fazla 20 dakika sonra yapılmalıdır. Yüzeyde kendiliğinden oluşan oksidasyon, daha yüksek bir dara absorbandsına neden olabilir.
3. İnkübasyon sırasında 350 ± 150 rpm'de sallanmanın, tahlilin hassasiyetini yaklaşık% 20 arttırdığı kanıtlanmıştır.

N. TAHLİL ŞEMASI

Yöntem	İşlem (Standard İnkübasyon)	İşlem (Kısa İnkübasyon)
Kontroller & Kalibratör	200 µL	200 µL
Sample Diluent & Numune	200 µL diluent.+ 10 µl numune	200 µL diluent.+ 10 µl numune
Assay Diluent	50 µL	50 µL
1. inkübasyon	60 dk (± 3)	45 dk (± 2)
Sıcaklık	+37°C	+37°C
Yıkama Adımı	4-5 döngü	4-5 döngü
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL
2. inkübasyon	30 dk (± 1)	45 dk (± 2)
Sıcaklık	+37°C	+37°C
Yıkama Adımı	4-5 döngü	4-5 döngü
Substrate TMB	100 µL	100 µL
3. inkübasyon	30 dk (± 1)	15 dk (± 1)
Sıcaklık	Oda sıcaklığı (18...24°C)	Oda sıcaklığı (18...24°C)
Stop Solution	100 µL	100 µL
Okuma OD	450/620nm	450/620nm

Aşağıdaki tabloda örnek dağıtım şekli gösterilmiştir (her iki inkübasyon süresi prosedürü için de geçerlidir):

Mikroplak												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Açıklama: BLK = Kör NC = Negatif Kontrol
CAL = Kalibratör PC = Pozitif Kontrol S = Numune

O. INTERNAL KALİTE KONTROL

Kitin OD450 / 620nm değerlerinin beklenen ve aşağıdaki tablodaki gibi olduğunu doğrulamak için, kontroller ve kalibre üzerinden bir kontrol gerçekleştirilir.

Kontrol edin	Gereklikler
Kör Kuyucuğu	< 0.100 OD 450/620nm
Negatif Kontrol (NC)	< 0.050 ortalama OD450/620nm (kör okumasından sonra)
Kalibratör	S/Co >1.1
Pozitif Kontrol (PC)	>1.000 OD450/620nm

Testin sonuçları yukarıda belirtilen gerekliliklerle uyumluysa, bir sonraki bölüme geçin. Aksi takdirde, devam etmeyin ve aşağıdaki kontrolleri yapın:

Sorunlar	Kontrol
Kör Kuyucuğu > 0.100 OD450nm	1. Substrate Solüsyonunun, analiz sırasında kontamine olup olmadığını;
Negatif Kontrol (NC) > 0.050 OD450nm (kör okumasından sonra)	1. yıkama prosedürünün ve yıkayıcı ayarlarının ön yeterlik çalışmasında doğrulanmış olduğunu; 2. uygun yıkama solüsyonunun kullanıldığını ve yıkayıcıda kullanılmadan önce prime işleminin yapılmış olduğunu; 3. tahlil prosedüründe herhangi bir hata yapılmadığını (negatif kontrol yerine pozitif kontrolün koyulması); 4. negatif kontrolde ya da kontrolün koyulmuş olduğu kuyucuklarda, pozitif numunelerin veya enzim konjugatın dökülmesi/saçılması nedeniyle, kontaminasyon oluşup-oluşmadığını; 5. mikropipetlerin, pozitif numunelerle veya enzim konjugat ile kontamine olmadığını; 6. yıkayıcı iğnelerinin bloke olmadığını veya kısmen tıkanmadığını.

Kalibratör S/Co<1.1	1. ya da 450/630nm'de < 0.800 OD 2. kalibratör eklenmesi esnasında, herhangi bir hata olmadığını (negatif kontrol yerine kalibratörün koyulması); 3. yıkama prosedürünün ve yıkayıcı ayarlarının ön yeterlik çalışmasında doğrulanmış olduğunu; 4. kalibratörde herhangi bir harici kontaminasyon olmadığını;
Pozitif Kontrol (PC) <1.000 OD450nm	1. ya da 450/630nm'de < 0.800 OD 2. kontrol eklenmesi esnasında, herhangi bir hata olmadığını (pozitif kontrol yerine negatif kontrolün koyulması); bu durumda, negatif kontrol,> 0.150'lik bir OD450nm değerine de sahip olacaktır. 3. yıkama prosedürünün ve yıkayıcı ayarlarının ön yeterlik çalışmasında doğrulanmış olduğunu; 4. pozitif kontrolde herhangi bir harici kontaminasyon olmadığını;

Yukarıdaki sorunlardan herhangi biri gerçekleşmişse, sorun hakkında daha fazla işlem için amirimize danışın.

P. SONUÇLAR

Test sonuçları, aşağıdaki formül ile belirlenen bir cut-off değeri ile hesaplanır:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC ortalama} + 0.350$$

Test için bulunan değerler, sonuçların sonraki paragrafta anlatıldığı şekilde yorumlanması için kullanılır.

Q. SONUÇLARIN YORUMLANMASI

Test sonuçları, aşağıdaki tabloya göre numune OD450nm ve cut-off (veya S/Co) oranı olarak yorumlanır:

S/Co	Yorum
< 0.9	Negatif
0.9 - 1.1	Şüpheli
> 1.1	Pozitif

Negatif bir sonuç, hastaya HCV'nin bulaşmamış olduğunu veya kan ünitesinin transfüze edilebileceğini gösterir. Şüpheli sonuç veren hasta, 1-2 hafta sonra tekrardan alınan bir numune ile tekrar test edilmeli ve değerlendirilmelidir. Kan, transfüzyon için kullanılmamalıdır.

Pozitif sonuç, HCV enfeksiyonunun göstergesidir ve bu nedenle hasta buna göre tedavi edilmelidir veya kan ünitesi atılmalıdır.

Önemli notlar:

1. Sonuçların yorumlanması, karar verme hataları ve yanlış yorumlama riskini azaltmak için laboratuvar amirinin gözetiminde yapılmalıdır.
2. Viral hepatit teşhisi konmadan önce, pozitif çıkan sonuç IgG ve IgM antikorlarını (onay testi) tespit edebilen alternatif bir yöntemle teyit edilmelidir.
3. Bu tahlil, ürünün Performans Değerlendirmesinde kanıtlandığı üzere, anti HCV çekirdek antikor serokonversiyonu, bazı diğer ticari kitlerden daha erken tespit edebilmektedir. Bu yüzden, diğer ticari kitlerle doğrulanmayan pozitif bir sonuç, yanlış pozitif

sonuç olarak ekarte **edilmemelidir!** Numune, yine de bir doğrulama testine tabi tutulmalıdır.

4. Tahlil IgM antikorlarını da tespit edebildiğinden, anti HCV antikorlarının tespiti için diğer ticari ürünler ile - enzim izleyici formülasyonunda anti hlgM konjugatı olmayan ve dolayısıyla IgM reaktivitesi eksik olan - bazı farklı sonuçlar doğabilir. HCV antikorları için numunenin gerçek pozitifliği, daha sonra HCV enfeksiyonunun teşhisi için önemli olan, IgM reaktivitesini inceleyerek doğrulanmalıdır.
5. Test sonuçları laboratuardan başka bir departmana iletildiğinde, hatalı veri aktarımını önlemek için dikkat edilmelidir.
6. Viral hepatit enfeksiyonu tanısı alındıktan sonra, uzman bir tıp doktoru tarafından hastaya iletilmelidir.

Hesaplama örneği aşağıda gösterilmiştir:

Aşağıdaki veriler, kullanıcı tarafından elde edilen gerçek rdeğerler yerine kullanılmamalıdır:

Negative Control (Negatif Kontrol): 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Ortalama değer: 0.020 OD450nm'de 0.050'den düşük - Kabul edilir

Positive Control (Pozitif Kontrol): 2.189 OD450nm'de 1.000'De yüksek – Kabul edilir

$$\text{Cut-Off} = 0.020 + 0.350 = 0.370$$

Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm Ortalama değer: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4 S/Co , 1.1'den yüksek – Kabul edilir

Numune 1: 0.070 OD450nm

Numune 2: 1.690 OD450nm

Numune 1 S/Co < 0.9 = negatif

Numune 2 S/Co > 1.1 = pozitif

R.PERFORMANSLAR

Performansların Değerlendirilmesi, Ortak Teknik Şartnamelerde veya CTS'de (98/79 / EC IV.Derg. Mad. 5'in 3. Bölümünde) belirtilenlere ve her iki inkübasyon prosedürüyle (standart ve kısa) uyumlu olarak gerçekleştirilmiştir.

1. TESPİT SINIRI

Testin saptama limiti, anti-HCV için İngiliz Çalışma Standardı, NIBSC kodu 06 / 188-006 ile, kısa inkübasyon tahlili kullanılarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki tabloda, negatif plazma dilüe edildiğinde ve incelendiğinde bu standardın ortalama OD450nm değerleri rapor edilmektedir.

Dilüsyon	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktör	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Negatif Plasma	0,25	0,20	0,20

Ayrıca, Boston Biomedica Inc., ABD tarafından sağlanan Accurun 1 - serisinden 3000 kodlu numune, aşağıdaki sonuçları gösterenler ile birlikte değerlendirildi:

Accurun 1 serisi	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktör	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. TANISAL ÖZGÜNLÜK VE HASSASİYET

Ürünün Performans Değerlendirmesi, toplam 5000'den fazla numune ile yürütülen bir araştırmada gerçekleştirildi

2.1 Tanısal özgünlük

Spesifik analit yokluğunda negatif puanlama, tahlilinin olasılığı olarak tanımlanır. İlk sefer bağışta bulunan donörler de dahil olmak üzere, toplam 5000'den fazla rastgele donör incelendi.

Tanısal özgünlük, ABD FDA onaylı bir kit üzerine değerlendirildi.

5043 kan donörü test edildi ve % 99.5 özgünlük alındı. Hastanede yatan 210 hasta, HCV Ab için test edildi; % 99.5'lik tanısal özgünlük bulundu. Bundan başka, potansiyel olarak etkileşim yapan 162 numune (diğer bulaşıcı hastalıklar, E.coli antikor pozitif, viral olmayan hepatik hastalardan etkilenen hastalar, diyaliz hastaları, gebe kadınlar, hemolize, lipemik vb.) test edilerek tanısal özgünlük değerlendirildi. % 100 özgünlük alındı.

Numune hazırlama yönteminden ötürü yanıltıcı reaktivite gözlemlenmemiştir. Farklı standart hazırlama teknikleriyle (sitrat, EDTA ve heparin) hazırlanan plazma ve serum numuneleri, özgünlüğü belirlemek için kullanılmıştır. Dondurulmuş numuneler de, toplamave depolama koşulları nedeniyle oluşan etkileşimleri kontrol etmek için test edilmiştir. Herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir.

2.2 Tanısal Hassasiyet

Spesifik analit varlığında pozitif puanlama, tahlilinin olasılığı olarak tanımlanır. Tanısal hassasiyet, toplam 348 numunede harici olarak değerlendirildi; tanısal hassasiyet % 100 bulunmuştur. Dahili olarak 50'den fazla başka pozitif numune test edildi ve yine % 100'lük bir tanısal hassasiyet değeri sağlandı. Farklı genotiplerin HCV tarafından gerçekleştirilen enfeksiyonlarından kaynaklanan pozitif numuneler de test edildi.

Ayrıca, Boston Biomedica Inc., ABD'den (PHV) ve Zeptometrix, USA'dan temin edilen serokonversiyon panellerinde de (HCV) incelenmiştir.

Sonuçlar, bazıları için aşağıdaki gibidir:

Panel	N° numuneler	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3

PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Not:

1. Pozitif nuune tespit edildi
2. HCV v.3.0

Son olarak, Ürün, Etablissement Francais Du Sang (EFS), Fransa tarafından sağlanan, aşağıdaki sonuçlar ile birlikte EFS Ac HCV, lot no. 06.140817 panelinde test edilmiştir:

EFS Panel Ac HCV

numune	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Ortalama değer
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negatif
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitif
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitif
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitif
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitif
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitif

3. KESİNLİK

Beş numunede hesaplanan, bir negatif ve dört pozitif, her biri altı ayrı çalışmada 4 tekrarda incelenmiştir. Her iki protokol için de elde edilen kesinlik, eşdeğerdir. Sonuçlar, aşağıdaki gibidir:

Lot-ici sonuçlar: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit – 1. Lot (kısa inkübasyon tahlili)

		Kesinlik - %CV		
Numune	S/Co Ortalama	Çalışma içi	Çalışmalar arası	Toplam
Negatif	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitif	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Lot-ici sonuçlar: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit – 1. Lot (uzun inkübasyon tahlili)

		Kesinlik - %CV		
Numune	S/Co Ortalama	Çalışma içi	Çalışmalar arası	Toplam
Negatif	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitif	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Lotlar arası sonuçlar: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit – 1., 2. and 3. Lot (kısa inkübasyon tahlili)

	Kesinlik - %CV		
Numune	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Negatif	8,65	8,29	6,13
Kalibratör	4,98	4,44	5,38
Pozitif	4,11	3,11	1,37

Yukarıdaki tablolarda gösterilen değişkenlik, numunelerin yanlış sınıflandırmasının sonucu değildir.

S. SORUN GİDERME ÖNERİLERİ

Test prosedürüne, spesifikasyonlara ve düzgün pipetleme işlemlerine bağlı kalınması, ayrıca reaktiflerin doğru bir şekilde kullanılması, aşağıdaki hataları önlemeye yardımcı olabilir:

HATA	OLASI NEDENLER / ÖNERİLER
OD, QC'de belirtilen OD'den çok farklı ($\pm$ % 50 OD)	- reaktiflerin yanlış dağıtım hacmi (öneri: Pipet tarafından verilen hacim ile tahlilin gerektirdiği hacim arasındaki uyumu kontrol edin; pipetleri yeniden kalibre edin.) -yanlış sıcaklık veya yanlış inkübasyon süresi (öneri: inkübatör bakımın yapın, inkübasyon başlangıcına dikkat edin) -yıkama veya fotometre okumasında hata (öneri: ilgili cihazların çalışmasını veya ayarlarını kontrol edin) -Substrate Solutions ya da Conjugaten kontaminasyonu (öneri: Sadece tek kullanımlık ve temiz plastik malzemeler kullanın)
Tekrarlanabilirliği düşük olan sonuçlar	-numunelerin veya reaktiflerin dağıtım hacimleri sabit değil. (öneri: pipetlerin hassasiyetini ve pipet ile dağıtılan hacim ile tahlilin gerektirdiği hacim arasındaki uyumu kontrol edin; pipetleri tekrar kalibre edin) -yıkama veya okumada hata (öneri: ilgili cihazların çalışmasını veya ayarlarını kontrol edin) -Substrate kontaminasyonu (öneri: Sadece tek kullanımlık ve temiz plastik malzemeler kullanın) -reaktiflerin degradasyonu ya da kontaminasyonu (öneri: Reaktifler için uygun pipet uçları, tek kullanımlık ve temiz plastik malzemeler, ve yüksek kalitede distile ya da eş değeri su kullanın)
substrat solüsyonunun eklenmesinden sonra, hiçbir kolorimetrik reaksiyon yok	-bazı reaktifler pipetlenmemiş - Conjugate ya da Substrate Solutions'da ağır kontaminasyon -tahlil prosedürünün uygulamasında hata (örneğin, reaktiflerin yanlış bir sırada veya yanlış şişeden kazara pipetlenmesi vb.)
Çok düşük reaksiyon (çok düşük OD)	-İnkübasyon süresi çok kısa, inkübasyon sıcaklığı çok düşük -Yalnız konjugat dilüsyonu

Çok fazla reaksiyon (çok yüksek OD)	-Yalnız konjugat dilüsyonu -inkübasyon süresi çok uzun, inkübasyon sıcaklığı çok yüksek -wash buffer'da kullanılan su kalitesi yetersiz (düşük dereceli deiyonizasyon) -yetersiz yıkama (konjugatlar düzgün giderilmemiş)
açıklanamayan aykırılıklar	-pipetlerin, pipet uçlarının ya da kapların kontaminasyonu -değişken ve yetersiz yıkama (konjugatlar düzgün giderilmemiş)
çalışma içi çok yüksek%CV	-kullanım öncesi Oda Sıcaklığı %CV için reaktifler ve/veya striplere ön ısıtma yapılmamış - plak yıkayıcı, doğru yıkama yapmıyor (öneri: yıkama kafasını temizleyin)
çalışmalar arası çok yüksek%CV	-inkübasyon koşulları sabit değil (zaman, sıcaklık) -Kontrol ve numuneler aynı zamanda dağıtılmamış (aynı aralıklarla) (pipetleme sırasını kontrol edin) -kişi ile ilgili varyasyonlar

T. OTOMASYON

Bu Kullanım Talimatında anlatılan prosedürler, sadece manuel test içindir. Otomatik cihazları kullanırken, cihazın üreticisi tarafından sağlanan kullanım kılavuzunda bulunan talimatları izleyin. Laboratuvarlar, bu ürünün otomatik sistemler ile uyumluluğunu kanıtlamak için, onaylı geçerlilik prosedürlerine uymalıdır.

U. SINIRLAMALAR

Tekrarlanabilir yanlış pozitif sonuçlar, RIBA veya benzeri doğrulama teknikleri ile teyit edilmedi, normal popülasyonun% 0.1'inden az olarak değerlendirildi. Çözündükten sonra fibrin parçacıkları veya agregalar içeren dondurulmuş numunelerin bazı yanlış sonuçlar verdiği görülmüştür.

BIBLIYOGRAPHI

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. MMWR 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. Hepatology 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. Viral Hepatitis and Liver Disease, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. JAMA 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. Ann Intern Med 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. Lancet 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. Am J Med Sci 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N Engl J Med 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. Science 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. N Engl J Med 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. N Engl J Med 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. N Engl J Med 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. Semin Liver Dis 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. Am J Epidemiol 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. West J Med 1992;156:30-5.
18. Fingerhood MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. Arch Intern Med 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. Am J Pub Health 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. Blood 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. Blood 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. J Med Virology 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. ASAIO Journal 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. J Infect Dis 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. JAMA 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. J Infect Dis 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. J Infect 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. J Infect Dis 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. Arch Intern Med 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. Infect Control Hosp Epidemiol 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. J. Clin. Microbiol. 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schilmovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. Hepatology 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. J. Clin. Microbiol. 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. J. Clin. Microbiol. 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. J. Hepatol. 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. Hepatology 16:293-299.

***H. pylori* Antigen ELISA Test Kit**

An enzyme immunoassay (ELISA) for the qualitative and quantitative detection of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

Antigen in human stool

IVD For *in vitro* diagnostic and professional use only

2°C  8°C Store at (2° to 8°C)

 96 Tests



INTENDED USE

The *H. pylori* Antigen ELISA Test Kit is an enzyme immunoassay for the qualitative and quantitative detection of *H. pylori* antigen in human stool. It is intended as an aid in the diagnosis of possible *H. pylori* infection and in the follow-up of patients undergoing antimicrobial therapy.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori are Gram-negative spiral-shaped bacteria that have adapted to living in the harsh acidic conditions of the stomach. These bacteria can alter their surrounding micro-environment by reducing its acidity so they can survive. Their spherical shape facilitates penetration of the epithelial lining, where the bacteria are protected by mucus against cells of the immune system.

Infections with *H. pylori*, though harmless during childhood, manifest as peptic ulcers of the stomach, duodenum and of small intestine, active and chronic gastritis, as well as non-ulcer dyspepsia, in about 60% of the global adult population. The mechanism of bacterial transmission is still unknown, but is thought to be oral and/or fecal borne.

The *H. pylori* Antigen ELISA Test Kit is an immunoassay for the qualitative and quantitative detection of *H. pylori* Antigen in human stool. The test utilizes antibodies to *H. pylori* to selectively detect *H. pylori* Antigen in human stool.

PRINCIPLE OF THE TEST

The *H. pylori* Antigen ELISA Test Kit is a solid phase enzyme immunoassay based on sandwich principle for the qualitative and quantitative detection of *H. pylori* antigen in human stool. The microwell plate is coated with anti-*H. pylori* antibodies. During testing, the antigens are extracted from the specimen with extraction solution and added onto the antibodies coated microwell plate along with the enzyme- conjugated antibodies to *H. pylori*, and then incubated. If specimens contain *H. pylori* antigens, it will bind to the antibodies coated on the microwell plate and simultaneously bind to the conjugate to form immobilized antibody-*H. pylori* antigen-conjugate complexes. If specimens do not contain *H. pylori* antigens, the complexes will not be formed. After initial incubation, the microwell plate is washed to remove unbound materials. Substrate A and substrate B are added and then incubated to produce a blue color indicating the amount of *H. pylori* antigens present in the specimens. Sulfuric acid solution is added to the microwell plate to stop the reaction producing a color change from blue to yellow. The color intensity, which corresponds to the amount of *H. pylori* antigens present in the specimens, is measured with a microplate reader at 450/630-700 nm or 450 nm.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use only.
- Follow the instructions for use carefully. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package insert.
- Wear protective clothing and disposable gloves when dealing with samples and reagents. Wash hands after operations.
- Do not use reagents beyond the labeled expiry date.
- Do not mix or use components from kits with different batch codes.
- It is important to calibrate all the equipment e.g. micropipettes, and/or the automated instruments used with this device, and to perform routine preventative maintenance.
- Ensure that the bottom of the plate is clean and dry and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
- Never eat, drink, smoke, or apply cosmetics in the assay laboratory. Never pipette solutions by mouth.
- Avoid cross contamination between reagents to ensure valid test results.
- Follow the wash procedure to ensure optimum assay performance.
- Use Plate Sealer to cover microwell plate during incubation to minimize evaporation.
- Use a new pipette tip for each specimen assayed.
- Do not touch or splash the rim of the well. Do not blow out from micropipettes.
- Do not allow sodium hypochlorite fumes from chlorine bleach or other sources to contact the microwell plate during the assay as the color reaction may be inhibited.

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- Collect samples in accordance with correct medical practices.
- Some reagents may cause toxicity, irritation, burns or have a carcinogenic effect as raw materials. Contact with the skin and the mucosa should be avoided but not limited to the following reagents: Stop solution, the Conjugate, and the Wash buffer, Extraction solution, Substrate.
- The Stop solution 0.5M H₂SO₄ is an acid. Use it with appropriate care. Wipe up spills immediately and wash with water if it comes into contact with the skin or eyes.
- ProClin™ 300 0.1% is used as a preservative; it can cause irritation of the skin. Wipe up spills immediately or wash with water if it comes into contact with the skin or eyes.
- Pipette tips, vials, strips and specimen containers should be collected and autoclaved for not less than 2 hours at 121°C before any further steps of disposal. Solutions containing sodium hypochlorite should NEVER be autoclaved.
- All specimens and materials should be considered as potentially infectious. Strict adherence to GLP (Good Laboratory Practice) regulations can ensure personal safety.
- Chemicals should be handled and disposed of only in accordance with the current GLP (Good Laboratory Practices) and the local or national regulations.
- Neutralized acids and other liquids should be decontaminated by adding sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1.0% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.

STORAGE AND STABILITY

- Components of the kit will remain stable through the expiration date indicated on the label and package when stored between 2-8°C, Once opened; all reagents are stable for up to 3 months after the first opening date if stored between 2-8°C. Return reagents to 2-8°C immediately after use.
- Place unused wells in the zip-lock aluminum foiled pouch and return to 2-8 °C, under which conditions the wells will remain stable for 3 months from the opening date.
- Concentrated Wash Buffer may be stored at room temperature to avoid crystallization. If crystals are present, warm up the solution at 37°C. Working Wash Buffer is stable for 2 weeks at room temperature.
- Do not expose reagents especially the Substrate to strong light or hypochlorite fumes during storage or incubation steps.
- Do not store Stop Solution in a shallow dish or return it to the original bottle after use.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- This *H. pylori* Antigen ELISA Test can be performed using only human stool.
- Stool samples should be collected in clean containers. Samples can be stored in the refrigerator (2-8 °C) for 1-2 days prior to testing. For longer storage, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample should be totally thawed and brought to room temperature before testing.
- The patient has to be asked to collect the specimen avoiding any possible contact with urine or water.
- The patient submitted to the test should not be under antibiotic or anti-bacterial treatments as this pharmaceutical therapy is known to affect *H. pylori* up to a certain extent, depending on the antibiotic used, giving rise to false interpretation.
- If specimens are to be shipped, they should be packed in compliance with local regulations covering the transportation of etiologic agents.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

1. ***H. Pylori* Antigen Microwell Plate:** Microwell plate coated with anti-*H. Pylori* antibodies. **(1 plate: 96 wells/plate).**
2. ***H. pylori* Antigen Conjugate:** One red cap vial containing antibodies to *H. pylori* bound to peroxidase; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. **(1 x 8 mL).**
3. **Concentrated Wash Buffer (25x):** One white cap bottle containing Tris-HCl buffer containing 0.1% Tween 20; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. **(1 x 40 mL).**
4. **Extraction Solution:** One white cap bottle containing 0.9% NaCl buffer containing EDTA; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. **(1 x100 mL).**
5. **Substrate A:** One white cap vial containing Citrate-phosphate buffer containing hydrogen peroxide; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. **(1 x 8 mL).**
6. **Substrate B:** One blue cap vial containing Buffer containing tetramethylbenzidine (TMB); Preservative: 0.1% ProClin™ 300. **(1 x 8 mL).**
7. **Stop Solution:** One yellow cap vial containing 0.5M Sulfuric acid. **(1 x 8 mL).**

8. **H.pylori Antigen Calibrator 1:** One white cap vial containing Buffer non-reactive for *H. pylori* Antigen; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. (1 x 1 mL).
9. **H.pylori Antigen Calibrator 2:** One white cap vial containing Buffer containing 0.1 µg/mL *H. pylori* Antigen; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. (1 x 1 mL).
10. **H.pylori Antigen Calibrator 3:** One white cap vial containing Buffer containing 0.5 µg/mL *H. pylori* Antigen; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. (1 x 1 mL).
11. **H.pylori Antigen Calibrator 4:** One white cap vial containing Buffer containing 1.0 µg/mL *H. pylori* Antigen; Preservative: 0.1% ProClin™ 300. (1 x 1 mL).
12. **Plate Sealers (2 pieces).**
13. **Package Insert (1 copy).**

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Freshly distilled or deionized water.
- Sodium hypochlorite solution for decontamination.
- Absorbent paper or paper towel.
- Water bath or incubator capable of maintaining 15°C to 30°C.
- Calibrated automatic or manual microwell plate washer capable of aspirating and dispensing 350 µL/well.
- Disposable gloves.
- Automated processor (optional).
- Calibrated micropipettes with disposable tips capable of dispensing 50 and 100 µL.
- Graduated cylinders for wash buffer dilution.
- Vortex mixer for specimen mixing (optional).
- Disposable reagent reservoirs.
- Calibrated microplate reader capable of reading at 450 nm with a 630-700 nm reference filter, or reading at 450 nm without a reference filter.
- Timer.

DIRECTIONS FOR USE

1. Remove unused strips from the microwell plate, and store in the original resealable pouch at 2-8°C.
2. Allow reagents and specimens to reach room temperature (15-30°C) prior to testing.

WASH PROCEDURE

- a. The wash procedure is critical. Insufficient washing will Result in a poor precision and falsely elevated absorbance readings.
- b. Prepare working wash buffer by adding content of wash buffer bottle provided with the kit to distilled or deionized water to reach a final volume of 1 liter. The working wash buffer is stable for 2 weeks at 15-30°C.
3. Dispense 1 mL of Extraction Solution into Specimen Extraction Tube.

For Solid Stool Specimens:

- i. Take out the cap of the **Specimen Extraction Tube**
- ii. Randomly stab the specimen collection stick into the stool specimen in at least 3 different sites to collect approximately 30 mg of specimen (equivalent to 1/4 of a pea). Do not scoop the stool specimen.
- iii. Transfer into Specimen Extraction Tube.

For Liquid Stool Specimens:

- i. Hold the Liquid Specimen Dropper vertically.

- ii. Aspirate stool specimens and then dispense 2 drops (approximately 50 µL) into the Specimen Extraction Tube containing the Extraction Solution.
 - iii. Screw on and tighten the cap onto the Specimen Extraction Tube.
 - iv. Shake the Specimen Extraction Tube vigorously to mix the specimen and the Extraction Solution.
4. Leave A1 as Blank well.
 5. Dispense 50 µL of Calibrator 1 in wells B1 and C1. (Light Yellow Reagent)
 6. Dispense 50 µL of Calibrator 2 in wells D1 and E1. (Green Blue Reagent)
 7. Dispense 50 µL of Calibrator 3 in wells F1 and G1. (Light Blue Reagent)
 8. Dispense 50 µL of Calibrator 4 in wells H1 and A2. (Dark Blue Reagent)
 9. Hold the Specimen Extraction Tube upright and break off the tip of the tube. Invert the Specimen Extraction Tube and dispense 2 drops of the specimen Extraction Solution (approx. 50 µL) to assigned wells starting at B2. (Yellow Reagent)
 10. Dispense 50 µL of Conjugate to each well except for the Blank well. (Red Reagent)
 11. Mix gently by swirling the microwell plate on a flat bench for 30 seconds.
 12. Cover the microwell plate with the Plate Sealer and incubate at room temperature (15-30°C) in a room, a water bath, or an incubator for 60 minutes ± 5 minutes.
 13. Remove the Plate Sealer.
 14. Wash each well 5 times with 350 µL of Working Wash Buffer per well, and then remove the liquid.
 15. Turn the microwell plate upside down on absorbent tissue for a few seconds. Ensure that all wells have been completely washed and dried.
Note: Improper washing may cause false positive results.
 16. Dispense 50 µL of Substrate A to each well. (Clear Reagent)
 17. Dispense 50 µL of Substrate B to each well. (Clear Reagent) Then a blue color should develop in wells containing Positive specimens.
 18. Mix gently then cover microwell plate with Plate Sealer and incubate at room temperature (15-30°C) in a room, a water bath, or an incubator for 10 minutes ± 1 minute.
 19. Remove the Plate Sealer.
 20. Dispense 50 µL of Stop Solution to each well. (Clear Reagent) Then a yellow color should develop in wells containing Positive specimens.
 21. Read at 450/630-700 nm within 30 minutes.
 22. Note: Microwell plate can also be read at 450 nm, but it is strongly recommended to read it at 450/630-700 nm for better results.

VALIDATION REQUIREMENT AND QUALITY CONTROL

1. Calculate the Mean Absorbance of Calibrators 1-4 by referring to the table below.

Example of Calibrator 2 Calculation	
Item	Absorbent
Calibrator 2: Well D1	0.469
Calibrator 2: Well E1	0.507
Total Absorbance of Calibrator 2	0.976
Mean Absorbance of Calibrator 2	0.488

2. Check the validation requirements below to determine if the test results are valid.

Item	Validation Requirements
Blank Well	Blank Absorbance should be < 0.050 if read at 450/630-700 nm Note: It should be < 0.100 if read at 450 nm
Calibrator 1	Mean Absorbance after subtraction of Blank Absorbance should be < 0.100
Calibrator 2	Mean Absorbance after subtraction of Blank Absorbance should be > 0.150
Calibrator 3	Mean Absorbance after subtraction of Blank Absorbance should be > 0.500
Calibrator 4	Mean Absorbance after subtraction of Blank Absorbance should be > 1.000

NOTE: The test results are considered invalid if the above validation requirements are not met. Repeat the test or contact your local distributor.

INTERPRETATION OF RESULTS

Qualitative

Calculate the Index Value to obtain qualitative specimen results.

1. If the test is valid, obtain Cut-Off Value by subtracting the Blank Absorbance from the Mean Absorbance of 1/2× (Calibrator 2+Calibrator 1). See an example of Cut-Off Value calculation below.

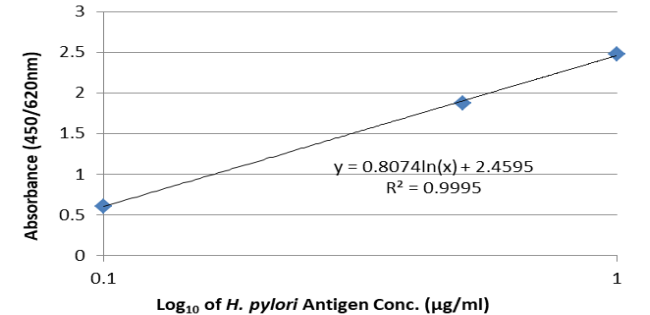
Item	Absorbent
Blank Absorbance: Well A1	0.011
Cut-Off Value: 1/2× (Mean Absorbance of Calibrator 2+ Mean Absorbance of Calibrator 1) – Blank Absorbance	1/2× (0.488+0.012)-0.011=0.239

2. Calculate the Index Value by dividing the Specimen Absorbance by the Cut-Off Value, and then read the results by referring to the Interpretation of Results table below.

Item	Absorbent
Specimen: Well F2	0.968
Blank Absorbance: Well A1	0.011
Cut-Off Value	0.239
Index Value: Specimen/Cut-Off Value	(0.968-0.011)/0.239=4.0

Quantitative

Draw the calibration curve and obtain quantitative specimen results.



1. Subtract the Blank Absorbance from the Mean Absorbance of each Calibrator, and then plot them on the Y-axis against their Log₁₀ of the corresponding concentration in µg/mL on the X-axis on a linear graph paper and draw the calibration curve. Draw the best fitted line through data points to obtain a standard curve. Refer to an example of the calibration curve at right.

NOTE: Do not use the calibration curve at right to make any calculation. A calibration curve must be performed for each run.

2. Obtain quantitative specimen results from their absorbance by using the calibration curve.

NOTE: Specimens that have absorbance above Calibrator 4 should be pre-diluted using Extraction Solution and retested. The concentration must be multiplied by the dilution factor. Automated reading and calculation may also be performed using linear regression function on suitable computer programs.

Interpretation of Results - Qualitative and Quantitative

Results	Qualitative	Quantitative
	Index Value	Concentration
Negative	< 0.9	< 0.045 µg/mL
Positive	> 1.1	> 0.055 µg /mL
Equivocal*	≥ 0.9 and ≤ 1.1	0.045 – 0.055 µg/mL

***NOTE:** For Equivocal results, the specimen should be retested. Specimens that are repeatedly Equivocal after retest should be confirmed using an alternate method. If the results remain Equivocal, collect a new specimen in two weeks. If the new specimen is Positive, the specimen is presumed to be Positive.

LIMITATIONS

1. The *H. pylori* Antigen ELISA Test Kit is used for the detection of *H. pylori* antigen in human stool. Diagnosis of an infectious disease should not be established based on a single test result. Further testing, including confirmatory testing, should be performed before a specimen is considered positive. A negative test result does not exclude the possibility of exposure. Specimens containing precipitate may give inconsistent test results.
2. As with all diagnostic tests, all results must be interpreted together with other clinical information available to the physician.
3. As with other sensitive immunoassays, a false positive result may arise due to inadequate washing from the initial test. The results may be affected due to procedural or instrument error.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity and Specificity

The *H. pylori* Antigen ELISA Test Kit has been compared to a leading commercial *H. Pylori* Antigen ELISA test using clinical specimens. The results show that the clinical sensitivity of the *H. pylori* Antigen ELISA Test Kit is 98.6%, and the clinical specificity is 95.4%.

H. pylori Antigen ELISA vs. Other ELISA

Method		Other ELISA		Total Results
<i>H. pylori</i> Antigen ELISA	Results	Positive	Negative	
	Positive	70	6	76
	Negative	1	125	126
Total Results		71	131	202

Clinical Sensitivity: 98.6% (92.4-100.0%) *

Clinical Specificity: 95.4% (90.3-98.3%)*

Overall Agreement: 96.5% (93.0-98.6%)*

*95% Confidence Interval

Reproducibility

Intra-Assay: Within-run precision has been determined by using 10 replicates of two specimens: a low positive and a high positive.

Inter-Assay: Between-run precision has been determined by using 10 replicates on the same two specimens: a low positive and a high positive. Three different lots of the *H. pylori* Antigen ELISA Test Kit have been tested using these specimens.

Specimen	Intra-Assay			Inter-Assay		
	Mean Absorbance/Cut-Off	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)	Mean Absorbance/Cut-Off	Standard Deviation	Coefficient of Variation (%)
1	1.741	0.156	8.96	1.723	0.133	7.72
2	4.726	0.252	5.33	4.861	0.252	5.18

REFERENCES

1. Marshall, BJ, McGechie, DB, Rogers, PAR and Glancy, RG. Pyloric Campylobacter infection and gastroduodenal disease. Med. J. Australia. (1985), 149: 439-44.
2. Soll, AH. Pathogenesis of peptic ulcer and implications for therapy. New England J. Med. (1990), 322: 909-16.
3. Ansorg, R, Von Recklinghausen, G, Pomarius, R and Schmid, EN. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation and preservation of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Micro. (1991), 29:51-53.
4. Pronovost, AP, Rose, SL, Pawlak, J, Robin, H and Schneider, R. Evaluation of a new immunodiagnostic assay for *Helicobacter pylori* antibody detection: Correlation with histopathological and microbiological results. J. Clin. Micro. (1994), 32: 46-50.
5. Megraud, F, Bassens-Rabbe, MP, Denis, F, Belbouri, A and Hoa, DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. J. Clin. Micro. (1989), 27: 1870-3.



ATLAS MEDICAL

Ludwig-Erhard Ring 3

15827 Blankenfelde-Mahlow

Germany

Tel: +49 - 33708 – 3550 30

Email: Info@atlas-medical.com

Website: www.atlas-medical.com

PPI1532A01

Rev B (21.10.2021)

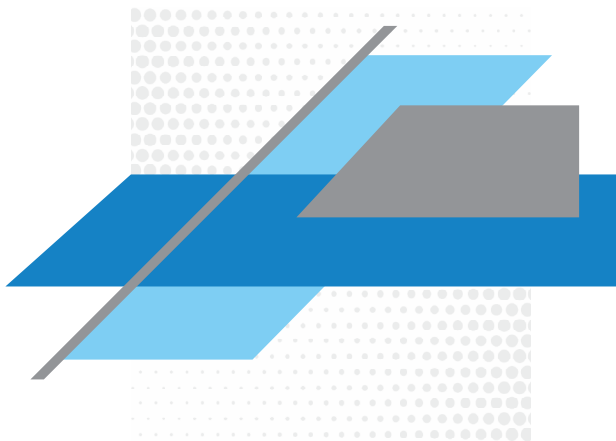
	Catalogue Number		Temperature limit
	In Vitro diagnostic medical device		Caution
	Contains sufficient for <n> tests and Relative size		Consult instructions for use (IFU)
	Batch code		Manufacturer
	Fragile, handle with care		Use-by date
	Manufacturer fax number		Do not use if package is damaged
	Manufacturer telephone number		Date of Manufacture
	Keep away from sunlight		Keep dry



anti-Trichinella spiralis

ELISA kit for the qualitative detection of antibodies to
Trichinella spiralis

Instructions for use



IVD

REF
EI-605

Σ 96
tests

CE

EQUI anti-*Trichinella spiralis*

ELISA kit for the qualitative detection of antibodies to *Trichinella spiralis*

1. INTENDED USE

The «EQUI anti-*Trichinella spiralis*» is ELISA kit intended to qualitatively detect anti-*Trichinella spiralis* antibodies in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose trichinosis. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: villagers, hunters and their families, people whose diet includes meat, particularly pork.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Among helminthiasis, which are often caused by meat consumption, trichinosis has a special place. The causative agent of this disease is the *Trichinella spiralis* roundworm, the larvae of which were found even in the mummies of Ancient Egypt. The greatest danger of this helminthiasis is the possibility of severe damage to the central nervous system, which leads to death.

Adult *Trichinella spiralis* have a filamentous body up to 0.5 mm in diameter and 2 mm in length. *Trichinella* is characterized by live birth – while in the human body, one female can give birth to about one and a half thousand rod-shaped larvae. The larvae actively migrate to other organs, but only settle massively in the striated muscles. Connective tissue capsule with feeding vessels gets formed around the larva after 1-1.5 months. About a year later, the capsule begins to calcify, but the larva inside remains alive and invasive for many years. Most mammals can become infected with trichinosis in the natural environment by eating fresh or decomposed meat that contains *Trichinella* larvae.

Trichinella enters the human body through the meat infested with encapsulated larvae (pork, horse meat, nutria's meat, wild boar, bear, etc.). Acute (intestinal) trichinosis may be asymptomatic or show symptoms 1-2 days after eating raw or undercooked meat. This stage of the disease is characterized by abdominal pain, nausea or diarrhea. However, the classic symptoms of trichinosis appear at the stage of larval migration about 2 weeks after the invasion and can last up to two months. These include fever, fatigue, muscle aches and pain, swelling of the face and eyes, skin rashes, and more. *Trichinella spiralis* affects the most active human muscles: diaphragm, intercostal and abdominal muscles, tongue, as well as facial and skeletal muscles. The overall extent of clinical manifestations is directly correlated with the quantity of consumed parasites.

During larval migration, the organism is hyper-sensitized by highly immunogenic products of *Trichinella* metabolism. Patients have eosinophilia and an increase in IgE antibodies. However, a strong immune response does not lead to the elimination of parasites, although it may be crucial for protection from re-infection.

Thus, recurring cases of trichinosis are much easier to tolerate than the primary ones.

To diagnose this helminthiasis, specific tests are conducted on meat that could be a source of invasion, to test for the presence of encapsulated larvae of *Trichinella spiralis*. During the early stages of infection, PCR is used to detect *Trichinella* DNA. A few weeks after the probable invasion, a biopsy of the affected patient's muscle tissue may be performed to detect the parasite. But from the second week of the invasion, serodiagnosis with the detection of specific antibodies to antigens of larvae of the pathogen trichinosis and an increase in the titer of these antibodies in paired sera is particularly useful. 4-5 months after the invasion, the number of specific antibodies decreases, but may remain at a level sufficient for detection for several years. Immunoblotting is used to confirm the positive result of the detection of specific IgG antibodies. However, for a comprehensive diagnosis of trichinosis we should use not only laboratory-generated data but also clinical and epidemiological studies.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-*Trichinella spiralis* antibodies in «EQUI anti-*Trichinella spiralis*» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Antigens of *Trichinella spiralis* larvae are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Trichinella spiralis* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species (anti-IgG and anti-IgA) monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS	1 x 96 wells	Microplate
		Each plate well is coated with <i>Trichinella spiralis</i> larvae antigens. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Positive control
		Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C

		Negative control
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
		Serum dilution solution
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (purple). Store at 2-8 °C
		Conjugate solution (ready to use)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG and IgA, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C
		TMB solution (ready to use)
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
		Washing solution TWEEN (20x concentrated)
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
		Stop Solution (ready to use)
SOLN STOP	1 x 13 ml	0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620-695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Besure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI anti-Trichinella spiralis» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;

- [SOLN|TMB] solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of [SOLN|TMB] with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI anti-Trichinella spiralis» kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

NOTE! It is very important to keep all ELISA kit components for at least 30 min at room temperature 18-25 °C before the assay!

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

- 9.4. Add 90 µL of [DIL|SAMPLE] into each plate well.
- 9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:
 [CONTROL|+] – into well A1,
 [CONTROL|-] – into wells B1, C1 and D1,
 and test samples into the remaining wells.
 At the time of adding, the solution changes its colour from purple to blue.
 Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.
- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
 – aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
 – add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
 – aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
 – repeat the washing step 4 more times;
 – after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN|CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\overline{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,3$$

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}} / CO, \text{ where } OD_{\text{sample}} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +	$OD \geq 1,0$
-----------	---------------

CONTROL -	$OD \leq 0,150$
-----------	-----------------

CONTROL -	$\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0$	where Ncn is the OD for each Nc run
-----------	---	-------------------------------------

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and Nc is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{\text{sample}} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{\text{sample}} < 0,9$	NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 32 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
G12	0,554	1,59	4,1
E5	0,999	2,87	6,5

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
G12	0,561	1,56	4,7
E5	1,042	2,89	7,1

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 μ mol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

Studies of the characteristics of the method in comparison with a similar commercial ELISA kit were performed on a sample of characterized serum and a sample of donor blood serum. The relative sensitivity of «EQUI anti-Trichinella spiralis» ELISA kits was determined from 24 serum samples that were tested for antibodies to anti-*Trichinella spiralis* and characterized as positive in a commercial ELISA kit. According to the results of the analysis, the relative sensitivity of the sets «EQUI anti-Trichinella spiralis» is 96%. Studies of the relative specificity of ELISA kits were performed on a complex of 260 samples of donor blood serum. According to research, the relative specificity of ELISA kits «EQUI anti-Trichinella spiralis» was 98%. The coincidence percentage is 97.86%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

A positive result in the «EQUI anti-Trichinella spiralis» ELISA kit is an indication that the patient has antibodies of IgG and / or IgA specific to *Trichinella spiralis*. The presence of IgG antibodies in newborns is not an evidence of *Trichinella spiralis* invasion.

Uncertain results may indicate a history of *Trichinella spiralis* invasion. A negative result in the «EQUI anti-Trichinella spiralis» ELISA kit indicates the absence of antibodies specific for *Trichinella spiralis* in the test sample or the concentration of specific antibodies below the sensitivity limit of the analysis. Specific antibodies may not be detected at the beginning of the clinical manifestations of the invasion. In this case, it is recommended to re-obtain and test serum samples from patients with clinical signs of trichinosis in one or two weeks.

The final diagnosis cannot be established solely on the basis of serological test results. When making a diagnosis the results of a set of laboratory and instrumental studies, should be taken into account as well as clinical manifestations of the disease. Cross-reactions with antibodies to antigens of other helminths cannot be completely ruled out. To exclude a false-positive result, it is recommended to conduct a verification study of positive samples by immunoblotting.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
High background in all wells	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$

Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Bruschi F., Murrell K. D. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species // *Postgraduate Medical Journal*. - 2002. - Vol. 78. - P. 15–22.
2. CDC. Parasites - Trichinellosis // <https://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis>.
3. Conlan J. V., Vongxay K. et al. Patterns and Risks of *Trichinella* Infection in Humans and Pigs in Northern Laos // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. - 2014. - Vol. 8(7). - e3034.
4. Gottstein B., Pozio E. and Nöckler K. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2009. - Vol. 22 (1). - P. 127–145.
5. Gu Y., Wei J. et al. Protective Immunity against *Trichinella spiralis* Infection Induced by a Multi-Epitope Vaccine in a Murine Model // *PLoS ONE*. - 2013. - Vol. 8(10). - e77238.
6. Neghina R., Moldovan R. et al. The roots of evil: the amazing history of trichinellosis and *Trichinella* parasites // *Parasitology Research*. - 2012. - Vol. 110 (2). - P. 503-508.
7. Sofronic-Milosavljevic L., Ilic N. et al. Secretory Products of *Trichinella spiralis* Muscle Larvae and Immunomodulation: Implication for Autoimmune Diseases, Allergies, and Malignancies // *Journal of Immunology Research*. - 2015. - Article ID 523875. - 14 p.
8. Wu Z., Sofronic-Milosavljevic L. et al. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair // *Parasites & Vectors*. - 2008. - Vol. 1:27. - 14.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results// Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 7, 01.06.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:

Obelis s.a.



Bd Général Wahis 53

1030 Brussels

Belgium

Tel: +(32)2 732-59-54

Fax: +(32)2 732-60-03

mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

Tel: 0(800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,

e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells (purple)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL][+], B1, C1, D1 – [CONTROL][-],
other wells – examined samples
(change of colour from purple to blue)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells (green)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at 450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

$$\overline{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \overline{Nc} + 0,3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO$$

$\overline{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL][-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

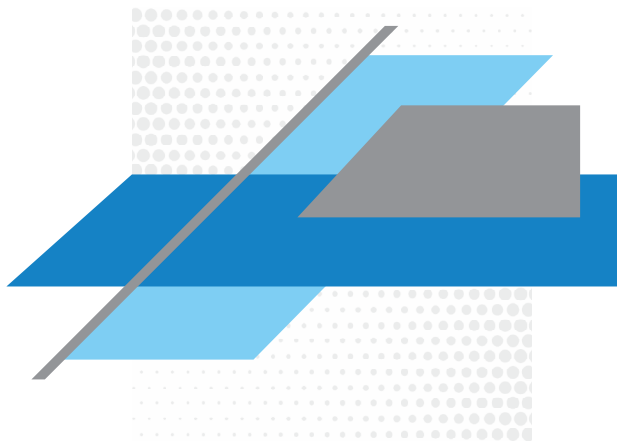
$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



Ascaris lumbricoides IgG

ELISA kit for the qualitative detection of IgG
antibodies to *Ascaris lumbricoides*

Instructions for use



IVD

REF
EI-601

Σ 96
tests

CE

EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG

ELISA kit for the qualitative detection of
IgG antibodies to *Ascaris lumbricoides*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» is ELISA kit intended to qualitatively detect anti-*Ascaris lumbricoides* IgG in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose lumbricosis. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: children, rural people, summer visitors.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Ascaris lumbricoides is a human parasite resulting in lumbricosis — one of the most common helminthiases in the world. By some estimates, over a milliard of people infested with acaricides are on earth.

Human ascaris belongs to *Nematoda* roundworms infesting the small intestine of a man who is its exclusive host. *Ascaris lumbricoides* eggs are excreted in the environment with faeces of the infested man. In a warm, wet soil, ascaris larvae develops in the eggs, therefore eggs become invasive only after a maturation period (2 to 3 weeks at 25–30 °C, lower temperatures require longer term). After infestation, larvae leave eggs in the human intestine, penetrates blood circulation and migrate to the liver and lungs with blood flow. The larvae move to the pharynx from the lungs, and here they are re-ingested and further enter the small intestine. In 2 to 3 months, adult ascaris able to propagate develops from larvae in the small intestine.

The helminths are transferred by faecal-oral route upon injection of mature eggs of *Ascaris lumbricoides* with soil-contaminated vegetables, fruits, water, as well as through dirty hands after contact with soil. Lumbricosis is conditionally divided into the early stage (migration of larvae) and late stage (parasitism of adults in the intestine). Invasion is asymptomatic in most cases. Primary feeling of being unwell occurs as early as several days after infestation and is accompanied by weakness, abdominal pain, nausea. Migration of larvae to the lungs may manifest as rales and cough. In some cases, intense invasion may result in pneumonia and liver damage. However, the most common symptom of early lumbricosis are allergic reactions due to hypersensitivity to metabolic products of larvae.

Late stage manifests as decreases appetite, abdominal pain, vomiting, diarrhoea, constipation. Massive ascaris invasion may result in the intestinal obstruction with a lump of helminths or rupture of the walls with peritonitis. When ascarides penetrate other organs, complications may develop such as

hepatitis, cholangitis, pancreatitis and even asphyxia. Cases of neurological disorders sometimes develop in lumbricosis, namely: headache, irritability, sleep impairment, inattention, etc. If no timely treatment is started for intense invasion, it may lead to death, especially in younger children.

Strong immune response to *Ascaris lumbricoides* invasion develops as early as at the early stage. It includes cellular and humoral immunity. Antigens of ascaris larvae stimulate secretion of all-class specific immunoglobulins, however, the level of specific and total IgE antibodies is the highest. The intensity of the immune response (including increased IgG titres) correlates with the massiveness of the invasion.

For diagnosis of lumbricosis, parasitologic stool test for presence of ascaris larvae and eggs is the most common. X-ray imaging of the lungs is additionally applied at the early stage of invasion. Complete blood count (eosinophilia develops in lumbricosis) and detection of serum anti-*Ascaris lumbricoides* antibodies also is included in the set of exams. The presence of specific anti-ascaris antibodies may suggest asymptomatic invasion, and allows initiation of treatment before complications develop in conjunction with other diagnostic instruments.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-*Ascaris lumbricoides* IgG in «EQUI Ascaris lumbricoides IgG» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Antigens of *Ascaris lumbricoides* larvae are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Ascaris lumbricoides* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgG monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS

1 x 96
wells

Microplate

Each plate well is coated with *Ascaris lumbricoides* antigen. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months

		Positive control
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
		Negative control
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
		Serum dilution solution
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C
		Conjugate solution (ready to use)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C
		TMB solution (ready to use)
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
		Washing solution TWEEN (20x concentrated)
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
		Stop Solution (ready to use)
SOLN STOP	1 x 13 ml	0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI Ascaris lumbricoides IgG» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;

- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- [SOLN|TMB] solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of [SOLN|TMB] with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at a temperature not less than 132°C;

- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

NOTE! It is very important to keep all ELISA kit components for at least 30 min at room temperature 18-25 °C before the assay!

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.
- 9.2. Fill in the sample application plan.
- 9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.
- 9.4. Add 90 µL of [DIL|SAMPLE] into each plate well.
- 9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:
[CONTROL|+] – into well A1,
[CONTROL|-] – into wells B1, C1 and D1,
and test samples into the remaining wells.
At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue. Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.
- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
– aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
– add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
– aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
– repeat the washing step 4 more times;
– after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN|CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN|TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN|STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN|TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN|TMB] and [SOLN|STOP] must be added

in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\bar{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \bar{Nc} + 0,3$$

$$IP_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}}/CO, \text{ where } OD_{\text{sample}} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

$$\boxed{\text{CONTROL} +} \quad OD \geq 1,0$$

$$\boxed{\text{CONTROL} -} \quad OD \leq 0,150$$

$$\boxed{\text{CONTROL} -} \quad \bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{where } Ncn \text{ is the OD for each } Nc \text{ run}$$

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\bar{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$$\begin{array}{ll} IP_{\text{sample}} > 1,1 & \text{POSITIVE} \\ 0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1 & \text{BORDERLINE*} \\ IP_{\text{sample}} < 0,9 & \text{NEGATIVE} \end{array}$$

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 24 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
547	0,504	1,43	2,9
671	0,753	2,13	3,6
413	1,165	3,30	3,1

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
547	0,534	1,55	5,0
671	0,750	2,17	4,6
413	1,159	3,36	3,6

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 µmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To evaluate clinical sensitivity and specificity of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kits, 55 serum samples from patients with clinical symptoms typical for lumbricosis and 60 serum samples from patients without clinical manifestations (seronegative in terms of *Ascaris lumbricoides*) were used. Clinical sensitivity of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kits was 94.55 % and clinical specificity — 93.3 %.

Method characteristics in comparison with equal commercial ELISA kit was studied in target paediatric population (160 samples) and population of donors (346 samples). For paediatric population serum, relative specificity of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kits was established at the level of 97.92 % and percent agreement was 95.51 %. For donor population serum, relative specificity of was 89.74 %, relative specificity — 96.30 % and percent agreement was 95.47 %.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kit supports presence of anti-*Ascaris lumbricoides* specific IgG antibodies. Presence of this class antibodies in newborns is not an evidence of *Ascaris lumbricoides* invasion.

Inconclusive results may suggest a history of *Ascaris lumbricoides* invasion.

Negative result of «EQUI *Ascaris lumbricoides* IgG» ELISA kit supports the absence of anti- *Ascaris lumbricoides* IgG specific antibodies in the test sample or concentration of specific antibodies is below the sensitivity limit of the assay.

The results of serological test only are not the basis for final diagnosis. When establishing the diagnosis, the results of complex laboratory and instrumental tests, as well as clinical manifestations should be considered. Cross-reactions with antibodies to antigens of other helminths cannot be fully ruled out.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. CDC - Ascariasis // <https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/index.html>.
2. Cooper P. J., Chico M. E. et al. Human Infection with *Ascaris lumbricoides* Is Associated with a Polarized Cytokine Response // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2003. - Vol. 182 (4). - P. 1207–1213.
3. Gupta S., Kumar S. et al. *Ascaris lumbricoides*: an unusual aetiology of gastric perforation // *Journal of Surgical Case Reports*. - 2012. - Vol. 2012. - rjs008.
4. Li Q., Zhao D. et al. Life-threatening complications of ascariasis in trauma patients: a review of the literature // *World Journal of Emergency Medicine*. - 2014. - Vol. 5 (3). - P. 165–170.
5. McSharry C., Xia Y. et al. Natural Immunity to *Ascaris lumbricoides* Associated with Immunoglobulin E Antibody to ABA-1 Allergen and Inflammation Indicators in Children // *Infection and Immunity*. - 1999. - Vol. 67(2). - P. 484–489.
6. Palmer L. J., Celedón J. C. et al. *Ascaris lumbricoides* Infection Is Associated with Increased Risk of Childhood Asthma and Atopy in Rural China // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. - 2002. - Vol. 165, No. 11. - P. 1489–1493.
7. Shalaby N. Effect of *Ascaris lumbricoides* infection on T helper cell type 2 in rural Egyptian children // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. - 2016. - Vol. 12. - P. 379–385.
8. WHO. Water related diseases: ascariasis. 2013 // http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/ascariasis/en/.
9. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
10. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
11. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
12. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
13. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
14. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results// Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 8, 10.02.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:

Obelis s.a.

Bd Général Wahis 53

1030 Brussels

Belgium

Tel: +(32)2 732-59-54

Fax: +(32)2 732-60-03

mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylkivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

Tel: 0(800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,

e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua



ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells (brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:

A1 – [CONTROL][+], B1, C1, D1 – [CONTROL][-],

other wells – examined samples

(change of colour from brown to blue)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells (green)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN (300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells (change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at 450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

$$\overline{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \overline{Nc} + 0,3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO$$

$\overline{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL][-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

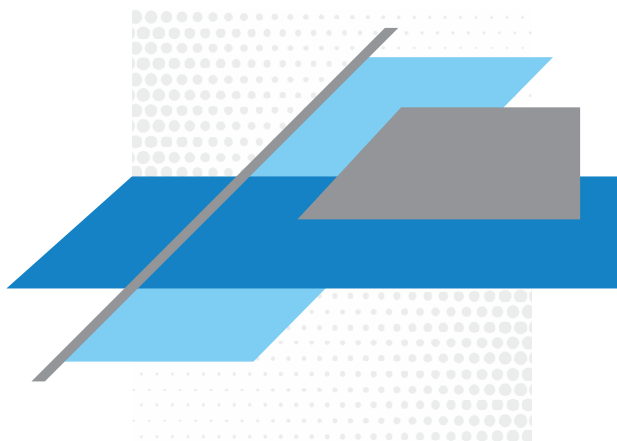
$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



HAV IgM

**ELISA kit for the qualitative detection of IgM
antibodies to hepatitis A virus**

Instruction for use



IVD

REF
EI-031

Σ 96
tests

CE

EQUI HAV IgM

ELISA kit for the qualitative detection
of IgM antibodies to hepatitis A virus

1. INTENDED USE

The «EQUI HAV IgM» is ELISA kit intended for the qualitative detection of IgM antibodies to hepatitis A virus in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to diagnose acute hepatitis A. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: blood or organ donors; pregnant women and children born to infected mothers; patients with symptoms of liver disease.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories, blood transfusion stations, as well as in other institutions working in the field of *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

One of the most common foodborne infections is hepatitis A. The hepatitis A virus (HAV) causes acute liver disease, which can be mild or severe. Unlike hepatitis B and C, this hepatitis does not become chronic, but can lead to acute liver failure, which is characterized by high mortality.

Hepatitis A virus is a small shellless RNA virus from the *Picornaviridae* family. It is characterized by being highly stable in different environments and can be stored at + 4 ° C for several months, but becomes inactive after 5 minutes at 100 ° C. The virus replicates in liver cells, and then is released through the bile into the environment with the fecal masses of the infected person. The cellular immune response to HAV infection leads to the destruction of hepatocytes, liver dysfunction and the development of symptoms, typical for other types of hepatitis.

Acute hepatitis A, even with the clinical manifestations, does not differ from other viral hepatitis. Therefore, serological markers of infection are used for diagnosis, namely the detection of specific antibodies to HAV antigens. IgM antibodies are detected in the serum 1-2 weeks after infection, with the onset of symptoms or a few days before. In the maximum titer of anti-CAA IgM are detected in the jaundice period, after that their level gradually decreases. In most patients, specific IgM ceases to be detected after 6 months, and may occasionally circulate in the blood for more than a year. IgG antibodies to HAV antigens begin to be released shortly after IgM antibodies and stay in the blood throughout life. Also, specific IgG is produced after a vaccination. Detection of IgG antibodies to CAA indicates the formation of a stable immunity due to infection or immunization.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

Detection of specific IgM antibodies to hepatitis A virus in the «EQUI HAV IgM» ELISA kit is based on the principle of «IgM capture» of solid-phase ELISA in a two-stage incubation. Monoclonal antibodies specific for human IgM immunoglobulins are adsorbed into the wells of the plate. During the first step of incubation of the

test samples in the wells of the ELISA plate, IgM immunoglobulins, if present in the samples, bind to monoclonal antibodies in the solid phase. The wells are washed to remove unbound components, leaving only specific antibody-antibody complexes. A mixture of HAV antigen and peroxidase conjugate of HAV-specific antibodies that bind to solid-phase immune complexes is then added. Unbound components are removed during washing. Immune complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After a 30-minute incubation, the reaction is halted by adding a stop solution. Optical density (OG) in the wells is determined on a spectrophotometer at a wavelength of 450 / 620-695 nm. The intensity of the yellow color is proportional to the number of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

STRIPS	1 x 96 wells	Microplate Each plate well is coated with monoclonal antibodies specific for human IgM immunoglobulins. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Positive control The solution of human IgM immunoglobulins crosslinked with monoclonal antibodies specific for horseradish peroxidase, with a preservative (pink). Store at 2-8 °C
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative control Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Serum dilution solution Buffer solution with monoclonal antibodies to human IgG, milk extract, detergent and preservative (brown). Store at 2-8 °C
CONJ 11x	1 x 1,3 ml	Conjugate (11x concentrated) 11-fold concentrate of conjugate of antibodies to hepatitis A virus with horseradish peroxidase in buffer solution with stabilizers (purple). Dilute the conjugate (11x) 1:11 with the conjugate dilution solution before use (eg 100 µl concentrate + 1 ml conjugate dilution solution, enough for 8 wells). Diluted solution should be stored at 2-8 °C for no more than 1 day
DIL CONJ	1 x 13 ml	Conjugate dilution solution Buffer solution of inactivated hepatitis A virus antigen with detergent and preservative (yellow). Store at 2-8 °C
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution (ready to use) TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C

TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	Washing solution TWEEN (20x concentrated) 20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
SOLN STOP	1 x 13 ml	Stop Solution (ready to use) 0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620-695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI HAV IgM» ELISA kit;
- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- **SOLN|TMB** solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of **SOLN|TMB** with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for conjugate solution and **SOLN|TMB**;
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI HAV IgM» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and conjugate solution with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;
- the solid waste must be inactivated by autoclaving at a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by

centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

NOTE! It is very important to keep all ELISA kit components for at least 30 min at room temperature 18-25 °C before the assay!

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

8.3. Conjugate solution preparation

Working dilution of the conjugate is prepared as follows: dilute **CONJ|11x** (purple) in a clean vial of solution **DIL|CONJ** (yellow) in the ratio 1:11 (ie, 1 + 10), the solution turns green. For example, for 8 well analysis add to 1 ml **DIL|CONJ** 100 µl **CONJ|11x**. The solution of the conjugate in the working dilution is stable during the day when stored at 2-8 °C.

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame.

Be sure to add control wells in every test run.

9.2. Fill in the sample application plan.

9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.

9.4. Add 90 µL of **DIL|SAMPLE** into each plate well.

9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:

CONTROL|+ – into well A1,

CONTROL|- – into wells B1, C1 and D1,

and test samples into the remaining wells.

At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue.

Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.

9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.

- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
- aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
 - add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
 - aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
 - repeat the washing step 4 more times;
 - after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Prepare conjugate solution as per para. 8.3.
- 9.9. Add 100 µL of conjugate solution into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **60 minutes at 37 °C**.
- 9.10. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.11. Add 100 µL of **SOLN|TMB** into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.12. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.13. Add 100 µL of **SOLN|STOP** into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding **SOLN|TMB**. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.14. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

*Measurement at the single wavelength of 450 nm is possible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only **SOLN|TMB** and **SOLN|STOP** must be added in blank well).*

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD of the negative control ($\overline{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

$$\overline{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \overline{Nc} + 0,3$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where } OD_{sample} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +

$$OD \geq 1,2$$

CONTROL -

$$OD \leq 0,150$$

CONTROL -

$$\bar{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \bar{Nc} \times 2,0 \quad \text{where } Ncn \text{ is the OD for each } Nc \text{ run}$$

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\bar{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$$IP_{\text{sample}} > 1,1$$

POSITIVE

$$0,9 \leq IP_{\text{sample}} \leq 1,1$$

BORDERLINE*

$$IP_{\text{sample}} < 0,9$$

NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 32 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
37s/2	1,576	4,85	5,3
24s	2,462	7,57	4,3

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for two sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
37s/2	1,600	4,78	6,3
24s	2,463	7,36	7,1

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 μmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

The diagnostic characteristics of the ELISA kit were evaluated by examining a set of 30 samples containing IgM antibodies to hepatitis A virus, a set of donor serum samples (188 samples) and samples of PHT202 Anti-Hepatitis A Virus (HAVed) panel. Performance Panel (contains 8 positive and 13 negative samples) - a total of 239 samples - was compared to similar commercial kits. For this set (239 samples) the relative sensitivity of the «EQUI HAV IgM» ELISA kit is 100%, the relative specificity - 100%, the percentage of coincidence - 100%.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

A positive result in the «EQUI HAV IgM» ELISA kit is the evidence that the patient has IgM antibodies specific for hepatitis A virus. Anti-CAA specific IgM antibodies are usually markers of active replication of hepatitis A virus.

In order to counteract the false-positive results caused by the presence of autoantibodies specific for class G immunoglobulins (rheumatoid factor) in human serum samples, the kit uses a special block component that prevents the formation of immune complexes with anti-human antibodies in the solid phase.

The final diagnosis cannot be established solely on the basis of serological test results. When making a diagnosis the results of a set of laboratory and instrumental studies, as well as clinical manifestations of the disease should all be taken into account.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer

<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. CDC. Hepatitis A - General Information // <https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/pdfs/hepageneralfact-sheet.pdf>.
2. Cuthbert J.A. Hepatitis A: Old and New // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2001. - Vol.14, No.1. - P. 38–58.
3. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Factsheet about hepatitis A // <https://ecdc.europa.eu/en/hepatitis-A/facts>.
4. Franco E., Meleleo C. et al. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries // *World Journal of Hepatology*. - 2012. - Vol. 4(3). - P. 68–73.
5. Koff R.S. Hepatitis A // *Lancet*. - 1998. - Vol 351. - P. 1643–1649.
6. Lima L.R., De Almeida A.J. et al. Evidence of Hepatitis A Virus Person-to-Person Transmission in Household Outbreaks // *PLoS One*. - 2014. - Vol. 9(7). - P. e102925.
7. Wang C.H., Tschen S.Y. et al. Immune response to hepatitis A virus capsid proteins after infection // *Journal of Clinical Microbiology*. - 1996. - Vol. 34, No. 3. - P. 707–713.
8. WHO Fact sheets. Hepatitis A // <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>.
9. Wu D., Guo C-Y. Epidemiology and prevention of hepatitis A in travelers // *Journal of Travel Medicine*. - 2013. - Vol.20(6). - P. 394–399.
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон України «Про відходи» // Відомості Верховної Ради України. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4.Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results// Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 6, 01.11.2021

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:



Obelis s.a.
Bd Général Wahis 53
1030 Brussels
Belgium
Tel: +(32)2 732-59-54
Fax: +(32)2 732-60-03
mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC
Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150
Tel: 0(800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,
e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells
(brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:

A1 – [CONTROL+], B1, C1, D1 – [CONTROL-],

other wells – examined samples

(change of colour from brown to blue)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of prepared 1:11 (1+10) conjugate solution into all wells
(green)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **60 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min in the dark at 18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells

(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO$$

$\bar{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

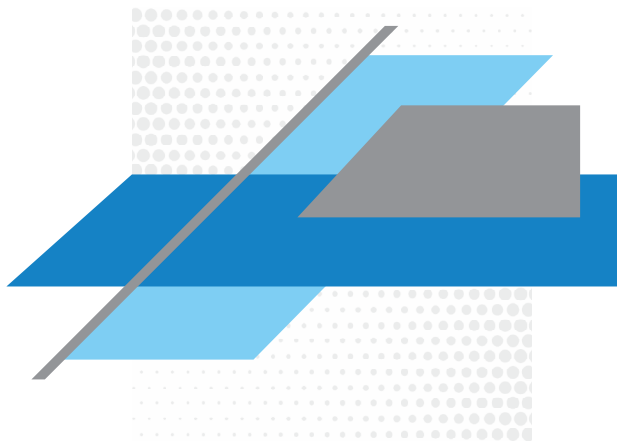
$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE



Toxocara canis IgG

ELISA kit for the qualitative detection of IgG
antibodies to *Toxocara canis*

Instructions for use



IVD

REF
EI-603

Σ 96
tests

CE

EQUI *Toxocara canis* IgG

ELISA kit for the qualitative detection of
IgG antibodies to *Toxocara canis*

1. INTENDED USE

The «EQUI *Toxocara canis* IgG» is ELISA kit intended to qualitatively detect anti-*Toxocara canis* IgG in human serum or plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in order to diagnose toxocariasis. The testing procedure is designed for both manual arrangement with automatic pipettes and standard equipment, and for automated «open» immunoassay analysers.

Target group: children, pet owners, rural people, summer visitors, forest guards, veterinarians.

Usage: ELISA kit is used in clinical diagnostic laboratories and other institutions engaged in *in vitro* diagnostics.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Toxocariasis is a common disease induced by *Toxocara* helminth which is transmitted from animals to human. Toxocariasis is spread throughout the world, however, it is more common in depressed areas with poor hygienic conditions. In some regions, up to 90 % of puppies and up to 10 % of adult domesticated dogs are infested with toxocara. The risk of infestation is higher for owners of cats and dogs and for children due to playing in the sandpits and on the playgrounds contaminated with animal faeces.

Toxocara are threadworms belonging to *Nematoda*. Human conditions are mostly caused by *Toxocara canis*, which infested canids, rare - *Toxocara cati*, which is more common in felids. Adult toxocara in the body of infested animals reaches 5–15 cm in length; their propagation takes place here. Female helminths lay about 200 thous eggs daily, which are excreted in the environment with faeces. If conditions are favourable, following several weeks of maturation in the soil they become invasive — a larva is developed in the eggs. In the paratenic host (mice, poultry, cows, pigs, etc.). larva develops without propagation. If the conditions are unfavourable, larvae are encapsulated and may maintain viability for a long time (up to 10 years). They may also be the source of invasion.

People are infested through faecal-oral route when ingesting *Toxocara canis* mature eggs with soil-contaminated vegetables, fruits, berries, via dirty hands or when consuming meat of paratenic hosts. In the small intestine, larvae leave their cover and penetrates blood circulation through the intestinal walls. The larvae migrate to other organs and tissues with blood, namely: liver, lungs, muscles, eyes, CNS, etc. In the most of the infested, toxocariasis is asymptomatic. Clinical manifestations of this disease are associated with the site of larvae migration and depend on the intensity of invasion and age of the host. Visceral syndrome larva migrans is typical after infestation of the internal organs with *Toxocara canis* and ocular

toxocariasis, when eye and optic nerve are involved. Symptoms of visceral toxocariasis: fever, fatigue, abdominal pain, anorexia, hepatomegaly, cough and others. Heart and respiratory failure may develop in severe cases. Due to a strong immune response to larvae antigens, immediate and delayed hypersensitivity reactions develop. Granulomatosis in ocular toxocariasis may result in retinal detachment and loss of vision.

Diagnosis of toxocariasis is complicated due to the lack of specific manifestations of the disease, even upon intense invasion. Furthermore, a man is an intermediate host of *Toxocara canis* and does not excrete parasites in the environment, whereas it is difficult to localise larvae in certain organs via non-invasive methods. Eosinophilia may appear in blood tests, however, serological tests are more common to detect toxocariasis (immunofluorescence reaction, ELISA and immunoblotting). Detection of specific anti-*Toxocara canis* IgG to larvae antigens may suggest current or previous invasion. High titer of IgE antibodies is also typical for active invasion. However, the combination of clinical manifestations and laboratory findings are necessary for diagnosis.

3. ANALYSIS PRINCIPLE

The procedure of testing for anti-*Toxocara canis* IgG in «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit is based on «indirect» solid-phase ELISA with a two-stage incubation. Antigens of *Toxocara canis* larvae are entrapped in the wells. During the first step of incubation of ELISA plate wells with test samples, specific anti-*Toxocara canis* antibodies (if present in the samples) bind to the solid-phase antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies and have only specific antigen-antibody complexes left. Then, a conjugate of anti-species IgG monoclonal antibodies with horseradish peroxidase is added, which binds to solid-phase immune complexes. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are detected by adding a solution of chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. After 30-minute incubation, the reaction is stopped by adding the stop solution. The optical density (OD) in the wells is determined using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The intensity of the yellow colour is proportional to the level of antibodies in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Contents of the ELISA kit

Microplate

Each plate well is coated with *Toxocara canis* larval antigens. The wells are detachable. After the first opening, store unused strips in the package at 2-8 °C for a maximum of 6 months

STRIPS

1 x 96 wells

		Positive control
CONTROL +	1 x 0,25 ml	Conjugated specific monoclonal antibody solution with preservative (pink). Store at 2-8 °C
		Negative control
CONTROL -	1 x 0,6 ml	Negative human serum with a preservative (yellow). Store at 2-8 °C
		Serum dilution solution
DIL SAMPLE	1 x 13 ml	Buffer solution with a milk extract, a detergent and a preservative (brown). Store at 2-8 °C
		Conjugate solution (ready to use)
SOLN CONJ	1 x 13 ml	Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgG, conjugated with horseradish peroxidase, with stabilizers and preservative (green). Store at 2-8 °C
		TMB solution (ready to use)
SOLN TMB	1 x 13 ml	TMB solution, H ₂ O ₂ , a stabilizer, a preservative (colourless). Store at 2-8 °C
		Washing solution TWEEN (20x concentrated)
TWEEN WASH 20x	1 x 50 ml	20-fold phosphate buffer concentrate with Tween-20 (colourless). Dilute TWEEN detergent (20x) at 1:20 with distilled or deionized water (e. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water for 8 wells) before use. Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days
		Stop Solution (ready to use)
SOLN STOP	1 x 13 ml	0.5 mol H ₂ SO ₄ solution (colourless). Store at 2-8 °C

The ELISA kit also includes adhesive films (2 items), sample application plan (1 item), checklist, and instruction for use.

4.2. Optional reagents, materials and equipment

Automatic single and multichannel pipettes 10–1000 µL, tips, volumetric laboratory glassware (10–1,000 mL), deionized or distilled water, thermostat at 37 °C, automatic or semi-automatic plate washer, spectrophotometer (reader) for microplates at 450/620–695 nm, appropriate containers for potentially contaminated waste, timer, filter paper, disposable powder-free gloves, disinfectants.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

Be sure to read the instructions for use carefully before the test. The validity of the test results depends on strict following of the test procedure.

- do not use the ELISA kit components after the expiry date;
- do not use for analysis or mix components of different batches, components of kits for different nosologies, or reagents from other manufacturers with the «EQUI Toxocara canis IgG» ELISA kit;

- do not freeze the ELISA kit or its contents;
- after using a reagent, close each vial with its cap;
- when washing, control filling and complete aspiration of solution from the wells;
- use a new pipette tip each time you add samples or reagents;
- prevent direct sunlight from reaching the reagents from the ELISA kit;
- [SOLN|TMB] solution must be colourless before use. Do not use the solution if its colour is blue or yellow. Avoid contact of [SOLN|TMB] with metals or metal ions. Use only clean glassware thoroughly rinsed with distilled water;
- do not use reagents with colour not in line with para. 4.1;
- under no circumstances should the same glassware be used for [SOLN|CONJ] and [SOLN|TMB];
- do not evaluate the test results visually (without a reader);
- any optional equipment that is in direct contact with biological material or kit components should be considered contaminated and requires cleaning and decontamination;
- the ELISA kit includes materials for 96 tests. Dispose of the used components as well as any remaining unused components.

5.2. Safety requirements

- all reagents in the ELISA kit are for laboratory professional use for *in vitro* diagnosis only and may only be used by qualified personnel;
- conduct the tests in disposable powder-free gloves and goggles only;
- do not eat, drink, smoke, or apply make-up in the test room;
- do not mouth-pipette the solutions;
- controls from the «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit have been tested and found to be for anti-HIV1/2, anti-HCV and anti-*Treponema pallidum* antibodies and HBsAg negative; however, controls and test samples should be handled as potentially hazardous infectious materials;
- some of the kit components contain low concentrations of harmful substances and can damage skin or mucosa. In case of contact of [SOLN|TMB], [SOLN|STOP] and [SOLN|CONJ] with mucous membranes or skin, immediately wash the affected area with plenty of water;
- in case of spillage of acid-free solutions, e. g. sera, treat the surface with a disinfectant solution and then wipe dry with filter paper. Otherwise first neutralize acid with sodium bicarbonate solution and then wipe the surface dry as described above.

5.3. Waste inactivation and disposal

- the liquid waste must be inactivated, for example, with hydrogen peroxide solution at the final concentration of 6% for 3 hours at room temperature, or with sodium hypochlorite at the final concentration of 5% for 30 minutes, or with other approved disinfectants;

- the solid waste must be inactivated by autoclaving at a temperature not less than 132°C;
- do not autoclave the solutions that contain sodium azide or sodium hypochlorite;
- disposal of inactivated waste must be conducted due to national laws and regulations.

6. STORAGE AND STABILITY

ELISA kit is stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C. The kit should be transported at 2-8°C. Single transportation at a temperature up to 23°C for two days is possible.

7. SAMPLE COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE GUIDELINES

Collect blood from the vein into the sterile test tube. Test tube must be marked with patient ID and date of sample collecting. Blood before serum separation can be stored at 2-8 °C for 24 hours, avoiding freezing.

Serum or plasma can be stored at 2-8 °C for maximum 3 days. Frozen serum can be stored for longer periods of time at -20 °C or -70 °C. Thaw frozen samples and keep them at room temperature for 30 minutes before use. After thawing, the stir samples to achieve homogeneity. Avoid repeated freezing-thawing cycles for test samples. If serum (or plasma) is turbid, remove insoluble inclusions by centrifugation at 3000 rpm for 10-15 minutes. Do not use serum samples with hyperlipidemia, hemolysis, and bacterial growth.

Transport serum samples in insulated containers. To do that, put closed labelled tubes in a plastic bag, tightly seal it and place in the centre of an insulated container. Put the frozen cold packs on the bottom, along the side walls of the insulated container and on top of the serum samples.

8. REAGENT PREPARATION

NOTE! It is very important to keep all ELISA kit components for at least 30 min at room temperature 18-25 °C before the assay!

8.1. Microplate preparation

To prevent water condensation in the wells, keep the **STRIPS** for 30 minutes at a room temperature before opening. Open the vacuum pack, detach the appropriate number of wells, and carefully pack the remaining wells with a desiccant and store tightly zip-locked at 2-8 °C. Storing the packed plate this way ensures its stability for 6 months.

8.2. Washing solution preparation

To prepare detergent, dilute **TWEEN|WASH|20x** at 1:20 (1+19) with distilled or deionized water and stir. E. g., 5 mL of concentrate + 95 mL of water, which is enough for 8 wells. If there are crystals present in the detergent concentrate, heat the vial at 37 °C until the crystals dissolve completely (15–20 minutes). Store the diluted solution at 2-8 °C for a maximum of 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

- 9.1. Prepare the necessary number of wells (four wells for controls and a necessary number of wells for test samples) and insert them into the ELISA plate frame. Be sure to add control wells in every test run.
- 9.2. Fill in the sample application plan.
- 9.3. Prepare the detergent as per para. 8.2.
- 9.4. Add 90 µL of [DIL][SAMPLE] into each plate well.
- 9.5. Add 10 µL of controls and test samples into the wells:
[CONTROL +] – into well A1,
[CONTROL -] – into wells B1, C1 and D1,
and test samples into the remaining wells.
At the time of adding, the solution changes its colour from brown to blue. Pipette the mix in the wells carefully to avoid foaming.
- 9.6. Cover the strips up with adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.7. Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
– aspirate the content of all wells into a liquid waste container;
– add a minimum of 300 µl of diluted washing solution to each well, soak each well for 30 seconds;
– aspirate the content of all wells again. The residual volume after every aspiration should be less than 5 µl;
– repeat the washing step 4 more times;
– after the final aspiration, eliminate extra moisture by tapping the plate against a piece of filter paper.
- 9.8. Add 100 µL of [SOLN][CONJ] into each well. Cover the strips with a new piece of adhesive film and incubate for **30 minutes at 37 °C**.
- 9.9. Following incubation, remove the film carefully and wash the wells five times as described in para. 9.7.
- 9.10. Add 100 µL of [SOLN][TMB] into the wells; do not touch the bottom and the walls of the plate wells.
- 9.11. Incubate the strips for **30 minutes** in a dark place at a room temperature of 18-25 °C. Do not use adhesive film at this stage.
- 9.12. Add 100 µL of [SOLN][STOP] into each strip well to stop the enzymatic reaction; adhere to the same sequence of actions as when adding [SOLN][TMB]. At the time of adding, the solution colour changes from blue to yellow, and clear solution slightly changes its shade.
- 9.13. Measure the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm wavelength using an ELISA microplate reader within 5 minutes after stopping the reaction. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and the absence of bubbles in the wells before reading.

Measurement at the single wavelength of 450 nm is impossible, in that case, it is needed to leave one well for blank (only [SOLN][TMB] and [SOLN][STOP] must be added

in blank well).

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Calculation of results

Calculate the average OD for the negative control ($\overline{Nc}$), Cut off (CO) and a sample positivity index (IP_{sample}).

$$\overline{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3; \quad CO = \overline{Nc} + 0,3$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO, \text{ where: } OD_{sample} \text{ is the OD sample.}$$

10.2. Quality control (assay validation)

The test results are considered valid if they meet the following requirements:

CONTROL +

 $OD \geq 1,0$

CONTROL -

 $OD \leq 0,150$

CONTROL -

 $\overline{Nc} \times 0,5 \leq Ncn \leq \overline{Nc} \times 2,0$ where Ncn is the OD for each Nc run

If any of the OD values for the negative control is beyond the above interval, it should be discarded, and $\overline{Nc}$ is calculated based on the remaining OD values for the negative control. If several OD values for the negative control fail to meet the above requirements, the test is considered invalid and requires a new run.

10.3. Interpretation of results

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE*
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

* Uncertain samples are recommended to be re-examined in two wells of the ELISA kit. If the results are again uncertain, a new sample should be selected and analyzed in 2-4 weeks. In case of repeated indeterminate results, such samples shall be considered negative.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical performance characteristics

Precision of measurement

Intra assay repeatability

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated in 24 replicates on one series of ELISA kits.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
669	0,927	2,81	4,8
544	1,503	4,56	1,4
666	1,694	5,14	4,5

Inter assay reproducibility

The coefficient of variation (CV) for three sera with different levels of specific antibodies was evaluated for 4 days in 4 sets of analysis, 8 replicates in each analysis.

Sample No.	OD _{av}	IP _{av}	CV, %
669	1,016	3,04	4,7
544	1,516	4,54	1,9
666	1,683	5,04	4,1

Analytical specificity

The test results are not affected by bilirubin at up to 0.21 mg/mL (361.8 µmol/L), haemoglobin at up to 10 mg/mL and triglycerides at up to 10 mg/mL (11.3 mmol/l) present in the sample.

11.2. Diagnostic characteristics

To evaluate diagnostic characteristics of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kits, 78 serum samples from patients with clinical symptoms typical for toxocariasis and 60 serum samples from patients without clinical manifestations (seronegative in terms of *Toxocara canis*) were used. Clinical sensitivity of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kits was 98.7 %, clinical specificity — 96.7 %.

Method characteristics in comparison with equal commercial ELISA kit was studied in target paediatric population (160 samples) and population of donors (298 samples). For paediatric population serum, relative specificity of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kits was established at the level of 99.28 % and percent agreement was 97.45 %. For donor population serum, relative specificity of was 89.19 %, relative specificity — 93.55 % and percent agreement was 91.73 %.

12. LIMITATIONS OF ASSAY

Positive result in «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit supports presence of anti-*Toxocara canis* specific IgG antibodies. Presence of this class antibodies in newborns is not an evidence of *Toxocara canis* invasion.

Inconclusive results may suggest a history of *Toxocara canis* invasion.

Negative result of «EQUI *Toxocara canis* IgG» ELISA kit supports the absence of anti-*Toxocara canis* specific IgG antibodies in the test sample or concentration of specific antibodies is below the sensitivity limit of the assay.

The results of serological test only are not the basis for final diagnosis. When establishing the diagnosis, the results of complex laboratory and instrumental tests, as well as clinical manifestations should be considered. Cross-reactions with antibodies to antigens of other helminths cannot be fully ruled out.

13. DIFFICULTIES THAT CAN OCCUR DURING THE ASSAY PROCEDURE

Possible reasons	Solution
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head and rinse according to the instructions for use
Poor quality or contaminated water	Use purified water with specific resistance $\geq 10 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
Use of poorly washed glassware	Use chemically clean utensils
Use of chlorinated disinfectants	Do not use chlorine disinfectants
Use of contaminated tips	Use new tips
Increased incubation times or change in the temperature conditions	Adhere to the incubation regime according to the instructions for use
<i>High background in a row of wells</i>	
Repeat application of TMB solution	TMB solution should be applied once
Contamination of the automatic pipette nozzle with conjugate solution	Clean the pipette and dial carefully liquid
Contamination of one of the washer's channel	Clean the flush channel, rinse washer
<i>Received OD of the positive control is below the border value</i>	
One of the reagents (conjugate solution or TMB solution) was not prepared in a correct way or was not added	Re-conduct ELISA, pay attention to the correctness of the introduction of these reagents
Reduced incubation times at any stage	Incubate according to instructions for use
<i>The colour density of the wells fails to meet the obtained optical density value</i>	
This may suggest that the optical beam has been displaced	Check the correct operation of the reader

14. TECHNICAL ASSISTANCE AND CUSTOMER SERVICE

In case of technical problems, you can obtain assistance by contacting the manufacturer.

REFERENCES

1. Cobzaru R. G., Rîpă C. et al. Correlation between asthma and *Toxocara canis* infection // *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. - 2012. - Vol. 116(3). - P. 727–730.
2. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2003. - Vol. 16, No. 2. - P. 265–272.
3. Havasiová-Reiterová K., Tomašovicová O. and Dubinský P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice // *Parasitology Research*. - 1995. - Vol. 81. - P. 13–17.
4. Iddawela D., Ehambaram K., and Bandara P. Prevalence of *Toxocara* antibodies among patients clinically suspected to have ocular toxocariasis: A retrospective descriptive study in Sri Lanka // *BMC Ophthalmology*. - 2017. - Vol. 17. - 6 p.
5. Maizels R. M. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion // *Veterinary Parasitology*. - 2013. - Vol. 193 (4). - P. 365–374.
6. Magnaval J.-F., Glickman L. T. et al. Highlights of human toxocariasis // *Korean Journal of Parasitology*. - 2001. - Vol. 39 (1). - P. 1–11.
7. McGuinness S. L., Leder K. Global Burden of Toxocariasis: A Common Neglected Infection of Poverty // *Current Tropical Medicine Reports*. - 2014. - Vol. 1 (1). - P. 52–61.
8. Núñez C. R., Mendoza Martínez G. D. et al. Prevalence and Risk Factors Associated with *Toxocara canis* Infection in Children // *The Scientific World Journal*. - Volume 2013. - Article ID 572089. - 4 p.
9. Okulewicz A., Perec-Matysiak A. et al. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores // *Helminthologia*. - 2012. - Vol. 49. - P. 3–10.
10. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU.
11. Закон України «Про відходи» // *Відомості Верховної Ради України*. - 1998. - №36-37.
12. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
13. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
14. Hanna Tolonen, Kari Kuulasmaa, Tiina Laatikainen, Hermann Wolf and the European Health Risk Monitoring Project. Recommendation for indicators, international collaboration, protocol and manual of operations for chronic disease risk factor surveys Part 4. Storage and transfer of serum/plasma samples// Finnish National Public Health Institute 2002// https://thl.fi/publications/ehrm/product2/part_iii4.htm
15. Surveillance Guidelines for Measles, Rubella and Congenital Rubella Syndrome in the WHO European Region. Annex 3.Collection, storage and shipment of specimens for laboratory diagnosis and interpretation of results//Geneva: World Health Organization; 2012 Dec.



Manufacturer



Authorized Representative in the European Community



In vitro diagnostic medical device



Catalogue number



Date of manufacture



Use by date



Batch code



Temperature limit



Contains sufficient for <n> tests



Caution



Non-Sterile



Consult instructions for use



Keep away from sunlight



Keep dry



Compliance with EU safety requirements

Edition 8, 04.04.2022

For questions and suggestions regarding the ELISA kit contact:

Obelis s.a.

Bd Général Wahis 53

1030 Brussels

Belgium

Tel: +(32)2 732-59-54

Fax: +(32)2 732-60-03

mail@obelis.net



Ekvittestlab LLC

Velyka Vasylykivska St. 114, Kyiv, Ukraine, 03150

Tel: 0(800)31-89-87, +38 (044)334-89-87,

e-mail: info@equitest.com.ua, www.equitest.com.ua

ASSAY PROCEDURE SCHEME

Keep all reagents for 30 min at temperature 18-25°C before use

Dispense 90 µl [DIL][SAMPLE] into the wells
(brown)

Add to 10 µl of controls and samples into the wells:
A1 – [CONTROL][+], B1, C1, D1 – [CONTROL][-],
other wells – examined samples
(change of colour from brown to blue)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][CONJ] into all wells
(green)

Cover strips with an adhesive film, incubate for **30 min at 37°C**

Rinse the wells 5 times with prepared 1:20 (1+19) washing solution TWEEN
(300 µl per well)

Add 100 µl of [SOLN][TMB] into all wells

Incubate for **30 min** in the dark at **18-25°C**

Add 100 µl of [SOLN][STOP] into all wells
(change of colour from blue to yellow)

Measure the optical density (OD) with an ELISA microplate reader at
450/620-695 nm

CALCULATION OF RESULTS

$$\bar{Nc} = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = \bar{Nc} + 0,3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO$$

$\bar{Nc}$ - the average value of OD 3-x [CONTROL][-]

CO - Cut off

IP_{sample} - sample positivity index

INTERPRETATION OF RESULTS

$IP_{sample} > 1,1$	POSITIVE
$0,9 \leq IP_{sample} \leq 1,1$	BORDERLINE
$IP_{sample} < 0,9$	NEGATIVE

Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood)



INTENDED USE

The Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood) is a rapid lateral flow chromatographic immunoassay for the simultaneous detection and differentiation of Malaria P.falciparum specific histidine rich protein-2 (Pf HRP-II) and Malaria P.vivax specific lactate dehydrogenase (Pv-LDH) in human blood specimen as an aid in the diagnosis of Malaria infection. It is for *In-Vitro* Diagnostic use only.

INTRODUCTION

Malaria is a serious, sometimes fatal, parasitic disease characterized by fever, chills, and anemia and is caused by a parasite that is transmitted from one human to another by the bite of infected Anopheles mosquitoes. There are four kinds of malaria that can infect humans: Plasmodium falciparum, P. vivax, P. ovale, and P. malariae. In humans, the parasites (called sporozoites) migrate to the liver where they mature and release another form, the merozoites. The disease now occurs in more than 90 countries worldwide, and it is estimated that there are over 500 million clinical cases and 2.7 million malaria-caused deaths per year. At the present, malaria is diagnosed by looking for the parasites in a drop of blood. Blood will be put onto a microscope slide and stained so that the parasites will be visible under a microscope.

PRINCIPLE

The Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood) contains a membrane, which is precoated with mouse monoclonal antibodies specific to HRP-II of P. falciparum on test line Pf region and with mouse monoclonal antibodies specific to lactate dehydrogenase of P. vivax species on test line Pv region respectively. Conjugate pad is dispensed with monoclonal antibodies conjugated to colloidal gold, which are specific to P. falciparum histidine rich protein-2 (Pf HRP-II) and specific to the lactate dehydrogenase of P. vivax.

During the assay, an adequate volume of the blood specimen is dispensed into the sample well (S) of the test cassette, a lysis buffer is added to the buffer well (B). The buffer contains a detergent that lyses the red blood cells and releases various antigens, which migrate by capillary action across the strip held in the cassette. Pv-LDH if presents in the specimen will bind to the Pv-LDH-gold conjugates. The immunocomplex is then captured on the membrane by the pre-coated anti-Pv-LDH antibody, forming a burgundy colored Pv band, indicating a Pv positive test result.

Alternatively, pHRP-II if presents in the specimen will bind to the pHRP-II-gold conjugates. The immunocomplex is then captured on the membrane by the pre-coated anti-pHRP-II antibodies, forming a burgundy colored Pf band, indicating a Pf positive test result.

Absence of any T bands suggests a negative result. The test contains an internal control (C band) which should exhibit a burgundy colored band of the immunocomplex of goat anti- mouse IgG I mouse IgG (anti-Pv-LDH and anti-pHRP-II)-gold conjugates regardless of the color development on any of the T bands. Otherwise, the test result is invalid and the specimen must be retested with another device.

MATERIALS SUPPLIED

25 Sealed pouches each containing a test cassette, a dropper and a desiccant
1 Buffer, 7.0 mL
1 Package insert

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Clock or timer
2. Collection by venipuncture: collection tube (containing EDTA, citrate or heparin)
3. Collection using a lancet: sterile lancet

STORAGE AND STABILITY

All reagents are ready to use as supplied. Store unused test device unopened, preferably at 2°C-30°C. Do not expose the kit over 30°C. Do not freeze the kit. Ensure that the test device is brought to room temperature before opening. The test device is stable through the expiration date printed on the sealed pouch if it is stored at 2°C-30°C.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For professional *in vitro* diagnostic use only. Do not use after expiration date.
2. The instruction must be followed exactly to get accurate results. Failure to follow the insert gives inaccurate test results.
3. Do not eat, drink or smoke in the area where the specimens or kits are handled.
4. Handle all specimens as if they contain infectious agents. Observe established precautions against microbiological hazards throughout testing and follow the standard procedures for proper disposal of specimens.

5. Hemolized blood may be used for the testing, but do not take precipitants.
6. Wear protective clothing such as laboratory coats, disposable gloves and eye protection when specimens are being tested.
7. Humidity and temperature can adversely affect results.
8. Do not perform the test in a room with strong air flow, ie. an electric fan or strong airconditioning.

SPECIMEN COLLECTION

Collection by venipuncture:

- 1) Collect whole blood into a collection tube (containing EDTA, citrate or heparin) by venipuncture.
- 2) If specimens are not immediately tested, they should be refrigerated at 2-8°C. For storage periods greater than three days, freezing is recommended. They should be brought to room temperature prior to use. Using the specimen after long-term storage of more than three days can cause non-specific reaction.
- 3) When stored at 2-8°C, the whole blood sample should be used within three days.

Collection using a lancet:

- 1) Clean the area to be lanced with an alcohol swab.
- 2) Squeeze the end of the fingertip and pierce with a sterile lancet.
- 3) Wipe away the first drop of blood with sterile gauze or cotton.
- 4) Using the dropper provided, while gently squeezing the tube, immerse the open end in the blood drop and then gently release the pressure to draw blood into the dropper.

TEST PROCEDURE

Allow the test device, specimen, buffer, and/or controls to equilibrate to room temperature (15-30°C) prior to testing.

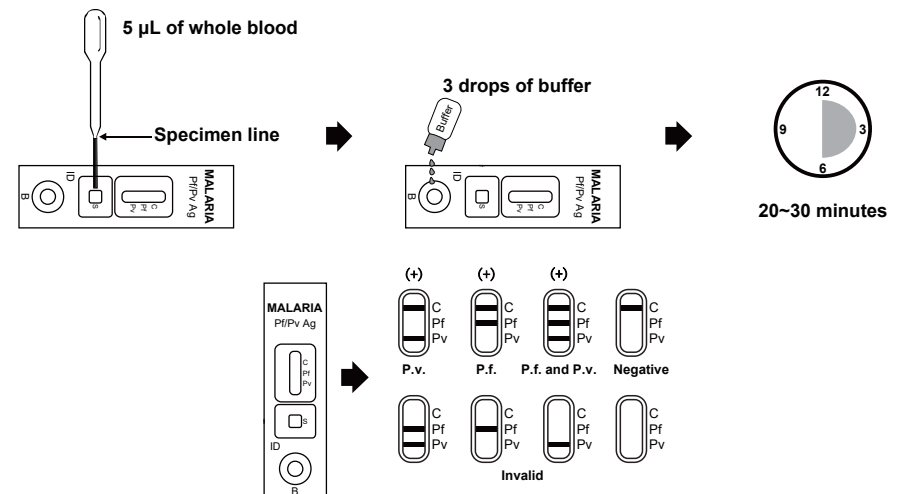
1. Remove the test cassette from the foil pouch and use it as soon as possible. Best results will be obtained if the assay is performed within one hour.
2. Place the test cassette on a clean and level surface. Be sure to label the device with specimen's ID number.
3. With a 5 µL mini plastic dropper provided, draw whole blood specimen to exceed the specimen line as showed in the following image and then transfer drawn whole blood into the sample well (S). Then add 3 drops (about 120 µL) of Lysis Buffer to the buffer well (B) immediately.

Note: Practice a few times prior to testing if you are not familiar with the mini dropper. For better precision, transfer specimen by pipette capable to deliver 5 µL of volume.

4. Set up timer.

If preferred, after 5 minutes of adding specimen and buffer, you may add one more drop of Lysis Buffer to help the background become clearer.

5. Results can be read in 20 to 30 minutes. It may take more than 20 minutes to have the background become clearer. Don't read results after 30 minutes. To avoid confusion, discard the test cassette after interpreting the result.



Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood)

INTERPRETATION OF RESULTS

(Please refer to the illustration above)

POSITIVE:

P.f Positive: One line appears in the control region, and one line appears in P.f. line region.

P.v Positive: One line appears in the control region and one line appears in Pv line region.

P.f and P.v Positive: One line appears in the control region, one line appears in Pv line region and one line appears in P.f. line region.

NEGATIVE: Only one colored line appears in the control region.

INVALID: Control line fails to appear. Insufficient specimen volume or incorrect procedural techniques are the most likely reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the test with a new test device. If the problem persists, discontinue using the test kit immediately and contact your local distributor.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. A colored line appearing in the control region (C) is an internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique. Control standards are not supplied with this kit; however, it is recommended that positive and negative controls be tested as a good laboratory practice to confirm the test procedure and to verify proper test performance.

LIMITATIONS

1. The Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood) is for *in vitro* diagnostic use only. This test should be used for the detection of P.f and P.v antigens in whole blood specimens only. Neither the quantitative value nor the rate of increase in P.f and P.v concentration can be determined by this qualitative test.
2. The Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood) will only indicate the presence of antigens of P.f and / or P.v in the specimen and should not be used as the sole criterion for the diagnosis of malaria infection.
3. As known relevant interference, haemolytic samples, rheumatoid factors-contained samples and lipaemic, icteric samples can lead to impair the test results.
4. The test is limited to the detection of antigen to Malaria Plasmodium sp. Although the test is very accurate in detecting HRP-II specific to P.f or pLDH specific to P.v, a low incidence of false results can occur. Other clinically available tests are required if questionable results are obtained.
5. If the test result is negative and clinical symptoms persist, additional testing using other clinical methods is recommended. A negative result does not at any time preclude the possibility of malaria infection.
6. As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should only be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Clinical Performance for P.f Ag test:

A total of 352 samples from susceptible subjects were tested by the Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood) and by thick blood smear test.

Method		Smear Test		Total Results
Malaria Pf/Pv Ag Rapid Test	Results	Positive	Negative	
	Positive	50	4	54
	Negative	0	298	298
Total Results		50	302	352

Relative Sensitivity: 100%

Relative Specificity: 98.7%

Overall Agreement: 98.9%

2. Clinical Performance for P.v Ag test:

A total of 289 samples from susceptible subjects were tested by the Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood) and by thick blood smear test.

Method		Smear Test		Total Results
Malaria Pf/Pv Ag Rapid Test	Results	Positive	Negative	
	Positive	63	3	66
	Negative	0	223	223
Total Results		63	226	289

Relative Sensitivity: 100%

Relative Specificity: 98.7%

Overall Agreement: 99.0%

3. Precision: Within-run and between-run have been determined by the testing 10 replicates of four specimens: a negative, a low positive, a medium positive and a strong positive. All values were correctly identified 100% of the time.

4. Interference: To evaluate the interference of Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood) with known relevant interfering specimens, the haemolytic samples, rheumatoid factors-contained samples and lipaemic, icteric samples were investigated. In these studies, those specimens did not interfere with the Malaria P.f./P.v. Ag Rapid Test Cassette (Whole Blood).

REFERENCE

1. Leonard K. Basco, Frederique Marquet, Michael M. Makler, and Jacques Le Bras.: Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: Lactate Dehydrogenase Activity and its Application for *in vitro* Drug Susceptibility Assay. Experimental Parasitology 80, 260-271 (1995)
2. David L. Vander Jagt, Lucy A. Hunsaker and John E. Heidrich : Partial Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase from Plasmodium falciparum. Molecular and Biochemical Parasitology, 4 (1981) 255-264
3. David J. Bzik, Barbara A. Fox and Kenneth Gonyer : Expression of Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase in Escherichia coli Molecular and Biochemical Parasitology, 59(1993) 155-166
4. Histidine-Rich Protein II: a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, June 2002, p. 1658©1664 Vol. 46, No. 6

INDEX OF SYMBOLS

	Consult instructions for use		Tests per kit		Authorized Representative
	For <i>in vitro</i> diagnostic use only		Use by		Do not reuse
	Store between 2~30°C		Lot Number		Catalog#



Zhejiang Orient Gene Biotech Co., Ltd
Address: 3787#, East Yangguang Avenue, Dipu Street,
Anji 313300, Huzhou, Zhejiang, China
Tel: +86-572-5226111 Fax: +86-572-5226222
Website: www.orientgene.com

EC REP

QARAD BV
Cipalstraat 3, 2440 Geel BELGIUM

REF

GCMAL(pf/pv)-402a

Revision Date: 2022-09-26
B20885-03

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces)



INTENDED USE

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces) is a rapid chromatographic immunoassay for the qualitative detection of human occult blood in feces by professional laboratories or physician's offices. It is useful to detect bleeding caused by a number of gastrointestinal disorders, e.g., diverticulitis, colitis, polyps, and colorectal cancer.

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces) is recommended for use in 1) routine physical examinations, 2) hospital monitoring for bleeding in patients, and 3) screening for colorectal cancer or gastrointestinal bleeding from any source.

INTRODUCTION

Most of diseases can cause hidden blood in the stool. In the early stages, gastrointestinal problems such as colon cancer, ulcers, polyps, colitis, diverticulitis, and fissures may not show any visible symptoms, only occult blood. Traditional guaiac-based method lacks sensitivity and specificity, and has diet-restriction prior to the testing.

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces) is a rapid test to qualitatively detect low levels of fecal occult blood in feces. The test uses double antibody-sandwich assay to selectively detect as low as 50 ng/mL of hemoglobin or 6 µg hemoglobin/g feces. In addition, unlike the guaiac assays, the accuracy of the test is not affected by the diet of the patients.

PRINCIPLE

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces) is a lateral flow chromatographic immunoassay based on the principle of the double antibody-sandwich technique. The membrane is pre-coated with anti-hemoglobin antibodies on the test line region of the device. During testing, the specimen reacts with the colloidal gold coated with anti-hemoglobin antibodies. The mixture migrates upward on the membrane chromatographically by capillary action to react with anti-hemoglobin antibodies on the membrane and generate a colored line. The presence of this colored line in the test region indicates a positive result, while its absence indicates a negative result. To serve as a procedural control, a colored line will always appear in the control line region indicating that proper volume of specimen has been added and membrane wicking has occurred.

MATERIALS PROVIDED

20 Test cassettes
20 Specimen collection tubes with buffer
1 Package insert

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Specimen collection containers 2. Clock or timer

STORAGE AND STABILITY

All reagents are ready to use as supplied. Store unused test device unopened at 2°C-30°C. If stored at 2°C-8°C, ensure that the test device is brought to room temperature before opening. The test is not stable out of the expiration date printed on the sealed pouch. Do not freeze the kit or expose the kit over 30°C.

PRECAUTIONS

1. For professional *in vitro* diagnostic use only.
2. This package insert must be read completely before performing the test. Failure to follow the insert gives inaccurate test results.
3. Do not use it if the tube/pouch is damaged or broken.
4. Test is for single use only. Do not re-use under any circumstances.
5. **Do not use specimen with visible blood for the testing.**
6. Handle all specimens as if they contain infectious agents. Observe established standard procedure for proper disposal of specimens.
7. Specimen extraction buffer contains Sodium Azide (0.1%). Avoid contact with skin or eyes. Do not ingest.
8. Wear protective clothing such as laboratory coats, disposable gloves and eye protection when specimens are assayed.
9. Humidity and temperature can adversely affect results.
10. Do not perform the test in a room with strong air flow, i.e. electric fan or strong air conditioning.

PATIENT PREPARATION

1. A specimen should not be collected from a patient with following conditions that may interfere with the test results:

- Menstrual bleeding
 - Bleeding hemorrhoids
 - Constipating bleeding
 - Urinary bleeding.
2. Dietary restrictions are not necessary.
 3. Alcohol and certain medications such as aspirin, indomethacin, phenylbutazone, reserpine, cortocosteroids, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs may cause gastrointestinal irritation and subsequent bleeding, thus gives positive reactions. On the advice of the physician, such substances should be discontinued at least 48 hours prior to testing.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Consider any materials of human origin as infectious and handle them using standard biosafety procedures.

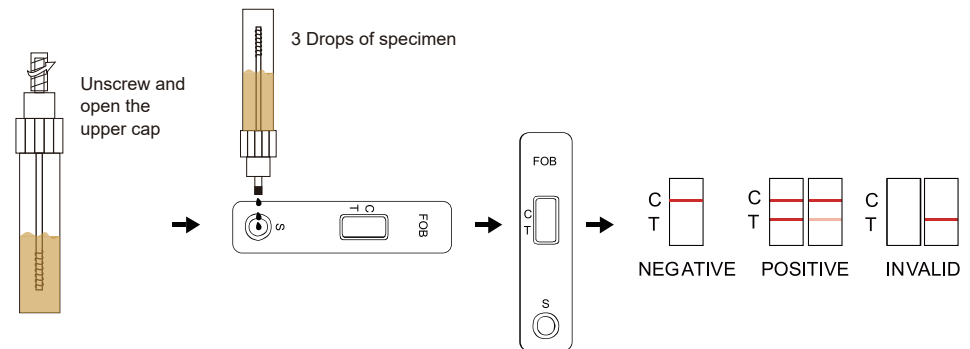
1. Collect a random sample of feces in a clean, dry receptacle.
2. Unscrew the top of the collection tube and remove the applicator stick.
3. Randomly pierce the fecal specimen in at least five (5) different sites.
4. Remove excess sample off the shaft and outer grooves. Be sure sample remains on inside grooves.
5. Replace the stick in the tube and tighten securely.
6. Shake the specimen collection bottle so that there is proper homogenisation of feces in buffer solution.

Note: Specimens prepared in the specimen collection tube may be stored at room temperature (15-30°C) for 3 days maximum, at 2-8°C for 7 days maximum or at -20°C for 3 months maximum if not tested within 1 hour after preparation.

TEST PROCEDURE

Allow the test cassette, specimen, and/or controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing.

1. Remove the test cassette from the foil pouch and use it as soon as possible. Best results will be obtained if the assay is performed within one hour.
2. Place the test cassette on a clean, flat surface.
3. Shake the specimen collection tube several times.
4. Hold the specimen collection tube upright and then unscrew and open the upper cap.
5. Squeeze 3 drops (~90 µL) of the sample solution in the sample well of the cassette and start the timer.
6. Wait for the colored line(s) to appear. Read results in 5 minutes. Do not interpret the result after 5 minutes.



INTERPRETATION OF RESULTS

(Please refer to the illustration above)

Positive: Two lines appear. One colored line should be in the control line region (C) and another apparent colored line should be in the test line region (T).

Negative: One colored line appears in the control line region (C). No line appears in the test line region (T).

Invalid: Control line fails to appear. The test should be repeated using a new cassette. If the problem persists, discontinue using the test kit immediately and contact your local distributor.

NOTE:

1. The intensity of color in the test region (T) may vary depending on the concentration of analytes present in the specimen. Therefore, any shade of color in the test region should be considered positive. Note that this is a qualitative test only, and

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces)

cannot determine the concentration of analytes in the specimen.

2. Insufficient specimen volume, incorrect operating procedure or expired tests are the most likely reasons for control band failure.

QUALITY CONTROL

An internal procedural control is included in the test. A colored line appearing in the control line region (C) is an internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume, adequate membrane wicking and correct procedural technique. Control standards are not supplied with this kit; however it is recommended that positive and negative controls be tested as a good laboratory practice to confirm the test procedure and to verify proper test performance.

LIMITATIONS

1. This test kit is to be used for the qualitative detection of human hemoglobin in fecal samples. A positive result suggests the presence of human hemoglobin in fecal samples. In addition to intestinal bleeding the presence of blood in stools may have other causes such as hemorrhoids, blood in urine etc.
2. Not all colorectal bleedings are due to precancerous or cancerous polyps. The information obtained by this test should be used in conjunction with other clinical findings and testing methods, such as colonoscopy gathered by the physician.
3. Negative results do not exclude bleeding since some polyps and colorectal region cancers can bleed intermittently or not at all. Additionally, blood may not be uniformly distributed in fecal samples. Colorectal polyps at an early stage may not bleed.
4. Urine and excessive dilution of sample with water from toilet bowl may cause erroneous test results. The use of a receptacle is recommended.
5. Feces specimens should not collect during the menstrual period and not three day before or afterwards, at bleeding due to constipation, bleeding haemorrhoids, or at taking rectally administered medication. It could cause false positive results.
6. This test may be less sensitive for detecting upper g.i. Bleeding because blood degrades as it passes through the g.i. Track.
7. The Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces) is to aid diagnosis and is not intended to replace other diagnostic procedures such as G.I. fibroscope, endoscopy, colonoscopy, or X-ray analysis. Test results should not be deemed conclusive with respect to the presence or absence of gastrointestinal bleeding or pathology. A positive result should be followed up with additional diagnostic procedures to determine the exact cause and source for the occult blood in the feces.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Sensitivity: 99.6%

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces) can detect the levels of human occult blood as low as 50 ng/mL hemoglobin or 6 µg hemoglobin/g feces.

2. Prozone Effect:

It is observed that this FOB test can detect 2 mg/mL hemoglobin.

3. Specificity: 99.9%

Fecal Occult Blood Rapid Test Cassette (Feces) is specific to human hemoglobin. Specimen containing the following substances at the standard concentration was tested on both positive and negative controls and showed no effects on test results at standards concentration.

Substances	Concentrations (Diluted with the extraction buffer)
Beef hemoglobin	2 mg/mL
Chicken hemoglobin	0.5 mg/mL
Pig hemoglobin	0.5 mg/mL
Goat hemoglobin	0.5 mg/mL
Horse hemoglobin	20 mg/mL
Rabbit hemoglobin	0.06 mg/mL

REFERENCES

1. Simon J.B. Occult Blood Screening for Colorectal Carcinoma: A Critical Review, Gastroenterology, Vol. 1985;88:820.
2. Blebea J. and Ncpherson RA. False-Positive Guaiac Testing With Iodine, Arch Pathol Lab Med, 1985;109:437-40.

INDEX OF SYMBOLS

	Consult instructions for use		Tests per kit		Authorized Representative
	For <i>in vitro</i> diagnostic use only		Use by		Do not reuse
	Store between 2~30°C		Lot Number		Catalog#

Zhejiang Orient Gene Biotech Co.,Ltd
Address: 3787#, East Yangguang Avenue, Dipu Street,
Anji 313300, Huzhou, Zhejiang, China
Tel: +86-572-5226111 Fax: +86-572-5226222
Website: www.orientgene.com

Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe)
Add: Eiffestrasse 80, 20537 Hamburg, Germany

GEFOB-602b

H. pylori Ag Rapid Test Cassette (Feces)



INTENDED USE

H. pylori Ag Rapid Test Cassette (Feces) is a sandwich lateral flow chromatographic immunoassay for the qualitative detection of H. Pylori antigen in feces. It is for professional *in vitro* diagnostic use only.

INTRODUCTION

H. Pylori is associated with a variety of gastrointestinal diseases included non-ulcer dyspepsia, duodenal and gastric ulcer and active, chronic gastritis.^{1,2} The prevalence of H. pylori infection could exceed 90% in patients with signs and symptoms of gastrointestinal diseases. Recent studies indicate an association of H. Pylori infection with stomach cancer.³ H. Pylori colonizing in the gastrointestinal system elicits specific antibody responses^{4,5,6} which aids in the diagnosis of H. Pylori infection and in monitoring the prognosis of the treatment of H. Pylori related diseases. Antibiotics in combination with bismuth compounds have been shown to be effective in treating active H. Pylori infection. Successful eradication of H. pylori is associated with clinical improvement in patients with gastrointestinal diseases providing a further evidence.⁷

PRINCIPLE

H. pylori Ag Rapid Test Cassette (Feces) is a lateral flow chromatographic immunoassay based on the principle of the double antibody-sandwich technique. The test cassette consists of: 1) a burgundy colored conjugate pad containing H. Pylori antibodies conjugated with color particles (H. Pylori conjugates). 2) a nitrocellulose membrane strip containing a test band (T band) and a control band (C band). The T band is pre-coated with non-conjugated H. Pylori antibodies.

When an adequate volume of test specimen is dispensed into the sample well of the cassette, the specimen migrates by capillary action across the cassette. The antigen of H. Pylori if present in the specimen will bind to the H. Pylori antibodies conjugates. The immunocomplex is then captured on the membrane by the pre-coated H. Pylori antibodies, forming a burgundy colored T band, indicating a H. Pylori antigen positive test result. To serve as a procedural control, a colored line will always appear in the control line region indicating that proper volume of specimen has been added and membrane wicking has occurred. Otherwise, the test result is invalid and the specimen must be retested with another device.

PRODUCT CONTENTS

H. pylori Ag Rapid Test Cassette (Feces) containing anti- H. pylori antibodies particles and anti-H. pylori antibodies coated on the membrane.

MATERIALS SUPPLIED

20 Sealed pouches each containing a test cassette and a desiccant
20 Specimen collection tubes with extraction buffer, 2.0 mL
1 Package insert

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Clock or timer
2. Specimen collection containers.

STORAGE AND STABILITY

All reagents are ready to use as supplied. Store unused test device unopened at 2°C-30°C. If stored at 2°C-8°C, ensure that the test device is brought to room temperature before opening. The test is not stable out off the expiration date printed on the sealed pouch. Do not freeze the kit or expose the kit over 30°C.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For professional *in vitro* diagnostic use only.
2. Do not use it if the tube/pouch is damaged or broken.
3. Test is for single use only. Do not re- use under any circumstances.
4. Handle all specimens as if they contain infectious agents. Observe established standard procedure for proper disposal of specimens
5. Wear protective clothing such as laboratory coats, disposable gloves and eye protection when specimens are assay.
6. Humidity and temperature can adversely affect results

SPECIMEN COLLECTION

Collect sufficient quantity of feces (1-2 mL or 1-2 g) in a clean, dry specimen collection container to obtain maximum antigens (if present). Best results will be obtained if the assay is performed within 6 hours after collection. Specimen collected may be stored for 3 days at 2-8°C if not tested within 6 hours. For long term storage, specimens should be kept below -20°C.

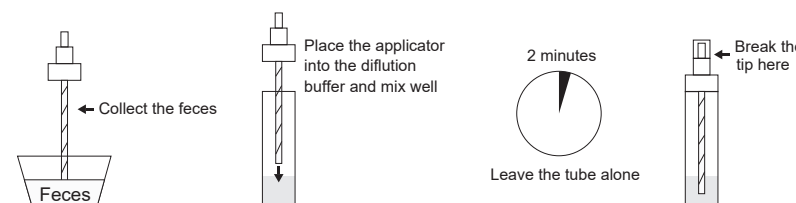
To process fecal specimens:

• For Solid Specimens:

Unscrew the cap of the specimen collection tube, then randomly stab the specimen collection applicator into the fecal specimen in at least 3 different sites to collect approximately 50 mg of feces (equivalent to 1/4 of a pea). Do not scoop the fecal specimen.

• For Liquid Specimens:

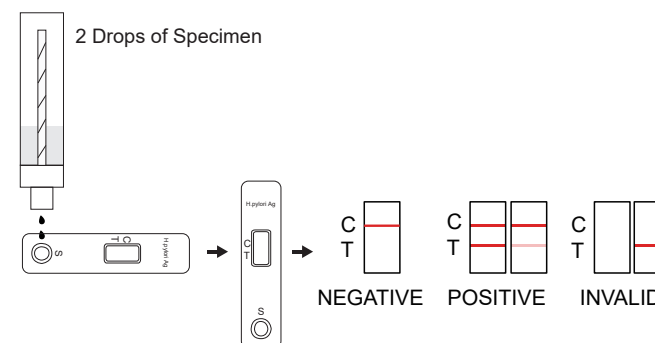
Hold the dropper vertically, aspirate fecal specimens, and then transfer 2 drops (approximately 80 µL) into the specimen collection tube containing the dilution buffer. Screw on and tighten the cap onto the specimen collection tube, then shake the specimen collection tube vigorously to mix the specimen and the dilution buffer. Leave the tube alone for 2 minutes.



TEST PROCEDURE

1. Remove the test device from its foil pouch by tearing along the notch and use it as soon as possible.
2. Specimen collection. See also specimen collection.
3. Holding the sample collection device upright, carefully break off the tip of collection device.
4. Squeeze 2 drops (~80 µL) of the sample solution in the sample well of the cassette, as in the illustration.
5. Read the test results in 10 minutes. It is important that the background is clear before the result is read. Do not read results after 10 minutes. To avoid confusion, discard the test device after interpreting the result.

INTERPRETATION OF RESULTS



H. pylori Ag Rapid Test Cassette (Feces)

Positive: Two lines appear. One colored line should be in the control line region (C) and another apparent colored line should be in the test line region (T).

Negative: One colored line appears in the control line region(C). No line appears in the test line region (T).

Invalid: Control line fails to appear.

QUALITY CONTROL

A procedural control is included in the test. A colored line appearing in the control line region (C) is an internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume, adequate membrane wicking and correct procedural technique.

Control standards are not supplied with this kit; however, it is recommended that positive and negative controls be tested as a good laboratory practice to confirm the test procedure and to verify proper test performance.

LIMITATIONS

1. The Assay Procedure and the Assay Result Interpretation must be followed closely when testing the presence of H. Pylori antigen in feces from individual subjects. Failure to follow the procedure may give inaccurate results.

2. H. pylori Ag Rapid Test Cassette (Feces) is limited to the qualitative detection of H. Pylori antigen in feces. The intensity of the test band does not have linear correlation with the antigen titer in the specimen.

3. A negative result for an individual subject indicates absence of detectable H. Pylori antigen. However, a negative test result does not preclude the possibility of exposure to or infection with H. Pylori.

4. A negative result can occur if the quantity of the H. Pylori antigen present in the specimen is below the detection limits of the assay, or the antigen that are detected are not present during the stage of disease in which a sample is collected.

5. The results obtained with this test should only be interpreted in conjunction with other diagnostic procedures and clinical findings.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A study was performed with 165 patient feces samples including both symptomatic gastrointestinal disorders and samples from non-symptomatic patients and 100 normal feces samples.Comparison for all subjects with H. pylori Ag Rapid Test Cassette (Feces) and reference ELISA kit is showed in the following table:

Method		EIA		Total Results
H.P Test Cassette	Results	Positive	Negative	
	Positive	163	0	163
	Negative	2	100	102
Total Results		165	100	265

Relative sensitivity: 98.8%

Relative specificity: 100%

Accuracy:98.9%

REFERENCE

1. Marshall,B.J.et.al. Pyloric Campylobacter infection and gastroduodenal disease. Med. J. Australia.149:439-44, 1985.

2. Marshall,B.J.et.al. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of Campylobacter pylori. Lancet. Dec.1437-42,1988.

3. Megraud,F.et.al. Seroepidemiology of Campylobacter pylori infection in virious populations J.Clin.Microbiology. 27:1870-3,1989.

4. Soll,A.H. Pathogenesis of peptic ulcer and implications for therapy. New England J. Med.322:909-916,1990.

5. Parsonnet,J.et.al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. New England J.Med. 325:1127-31,1991.

6. Ansong,R. et.al. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation and preservation of Helicobacter pylori. J.Clin.Micro. 29:51-53,1991.

7. Pronovost,A.P.et.al. Evaluation of a new immunodiagnostic assay for Helicobacter pylori antibody detection: Correlation with histopathological and microbiological results. J.Clin.Microbiol.32:46-50,1994.

INDEX OF SYMBOLS

	Consult instructions for use		Tests per kit		Authorized Representative
	For <i>in vitro</i> diagnostic use only		Use by		Do not reuse
	Store between 2~30°C		Lot Number		Catalog#



Zhejiang Orient Gene Biotech Co.,Ltd
Address: 3787#, East Yangguang Avenue, Dipu Street,
Anji 313300, Huzhou, Zhejiang, China.
TEL: +86-572-5226111 FAX: +86-572-5226222
Website: www.orientgene.com



Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe)
Add: Eiffestrasse 80, 20537 Hamburg, Germany



GCHP-602a

Revision Date: 2022-03-08
B20435-03

Vitrotest® EBV VCA-IgM

Иммуноферментная тест-система для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр (VCA).

TK052

96 анализов

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментная тест-система «Vitrotest EBV VCA-IgM» предназначена для качественного и полуколичественного определения антител класса IgM к капсидному антигену (VCA) вируса Эпштейна-Барр в сыворотке или плазме крови человека.

Тест-набор может быть применен как для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием автоматических пипеток и стандартного оборудования, так и для постановки на автоматическом иммуноферментном анализаторе открытого типа.

2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), также известный, как вирус герпеса человека 4-го типа, является этиологическим агентом таких заболеваний, как инфекционный мононуклеоз (ИМ), лимфома Беркитта (ЛБ), назофарингеальная карцинома.

Заражение ВЭБ в раннем детстве является преимущественно бессимптомным. Инфицирование в подростковом или раннем взрослом периоде часто влечет клинический ИМ. В типичном случае болезнь проявляется как фарингит, лимфаденопатия и лихорадка. В большинстве случаев симптомы исчезают через 2-4 недели, однако, у более 90% взрослых развивается латентная инфекция в В-лимфоцитах. Примерно у 1% иммунокомпетентных индивидов могут возникать тяжелые осложнения (гепатит, миокардит, разрыв селезенки, неврологические осложнения). В иммуносупрессированных лиц первичная ВЭБ-инфекция приводит к тяжелым расстройствам (например, ЛБ).

Для лабораторной диагностики ВЭБ-инфекции применяют полимеразную цепную реакцию и серологические методы исследований, которые включают тест на выявление гетерофильных антител и определение специфических антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Последний метод позволяет не только установить факт инфицирования ВЭБ, но и стадию заболевания.

Оптимальная комбинация серологических тестов для диагностики ВЭБ-инфекции включает выявление IgG и IgM антител, специфичных к вирусному капсидному антигену (анти-VCA-IgG, анти-VCA-IgM) и ядерному антигену (анти-EBNA-IgG). Анти-VCA-IgM антитела появляются в организме при ранней инфекции и исчезают в течение 4-12 недель. IgG к VCA выявляются несколько позже (через 2-4 недели после инфицирования), их концентрация достигает максимального уровня также на начальных стадиях заболевания, постепенно снижаясь, однако, эти антитела определяются в течение всей жизни. Если антитела к вирусному капсидному антигену не определяются, то человек является восприимчив к ВЭБ-инфекции.

Анти-EBNA-IgG вырабатываются организмом через 2-4 месяца после появления симптомов, у большинства инфицированных их высокий уровень сохраняется в течение всей жизни. Одновременное обнаружение IgG, специфических к EBNA и VCA, является показателем паст-инфекции.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Определение антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр в тест-системе «Vitrotest EBV VCA-IgM» основывается на принципе «IgM-захвата» твердофазного ИФА в двухэтапной инкубации. В лунках планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам класса IgM человека. Во время первого этапа инкубации исследуемых образцов в лунках ИФА-планшета иммуноглобулины класса IgM связываются с моноклональными антителами на твердой фазе. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляется конъюгат рекомбинантного капсидного антигена Эпштейна-Барр с пероксидазой хрена, который связывается с анти-VCA специфическими IgM в составе образованных иммунных комплексов на твердой фазе. Несвязанные компоненты удаляются во время отмывания. Иммунные комплексы выявляются добавлением раствора хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с перекисью водорода. После 30-ти минутной инкубации реакция останавливается и оптическая плотность (ОП) в лунках определяется на спектрофотометре при длине волны 450/620-695нм. Значение ОП, полученное для образца, позволяет выявить наличие или отсутствие антител класса IgM к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр. Интенсивность желтой окраски пропорциональна количеству антител в образце.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

4.1. Состав набора

ELISA STRIPS	1x96 лунки	ИФА-планшет (12 стрипов по 8 лунок) В каждой лунке планшета засорбированы моноклональные антитела, специфичные к иммуноглобулинам класса IgM человека. Лунки можно отделять.
---	------------	--

CONTROL +	1x0,5 мл	Положительный контроль Раствор иммуноглобулинов с консервантом (розовый)
CONTROL -	1x0,5 мл	Отрицательный контроль Раствор альбумина с консервантом (желтый).
SAMPLE DILUENT	1x12 мл	Раствор для разведения сывороток Буферный раствор с детергентом и консервантом (фиолетовый).
CONJUGATE DILUENT	1x13 мл	Раствор для разведения конъюгата Буферный раствор с детергентом и консервантом (желтый).
CONJUGATE 11X	1x1,3 мл	Конъюгат (11х концентрат) 11-ти кратный концентрат конъюгата рекомбинантного капсидного антигена вируса Эпштейна-Барр с пероксидазой хрена в буферном растворе со стабилизаторами (синий).
TMB SOLUTION	1x12 мл	Раствор ТМБ (готов к использованию) Раствор ТМБ, H ₂ O ₂ , стабилизатор, консервант (бесцветный).
WASH TWEEN 20X	1x50 мл	Раствор для промывания Tw20 (20х концентрат) 20-ти кратный концентрат фосфатного буфера с Твином-20 и NaCl (бесцветный).
STOP SOLUTION	1x12 мл	Стоп-реагент (готов к использованию) Раствор 0,5 M H ₂ SO ₄ (бесцветный).

Клейкая пленка (2), бланк внесения проб (1) и инструкция по применению.

4.2. Дополнительные реактивы, материалы и оборудование

- Автоматические пипетки переменного объема на 10-1000 мкл и наконечники к ним;
- спектрофотометр (ридер) для микропланшетов на 450/620-695 нм,
- мерная лабораторная посуда (10-1000 мл);
- деионизированная или дистиллированная вода;
- термостат на 37°C;
- автоматический или полуавтоматический промыватель планшетов (вошер);
- контейнеры для отходов потенциально зараженного материала;
- таймер;
- фильтровальная бумага;
- одноразовые перчатки;
- дезинфицирующие средства;
- защитная одежда.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Предостережения

Соблюдение времени инкубации и температуры является чрезвычайно важным для корректного результата ИФА.

- не использовать компоненты тест-системы по окончании срока годности;
- не использовать при анализе и не смешивать компоненты разных серий, компоненты из тест-систем различных нозологий или реагенты других производителей в сочетании с наборами Vitrotest®;

*Примечание: допускается использование **WASH TWEEN 20X**, **TMB SOLUTION** и **STOP SOLUTION** других серий.*

- после использования реагента закрывать каждый флакон своей крышкой;
- во время промывания контролировать наполнение и полную аспирацию раствора из лунок;
- каждый раз использовать новый наконечник пипетки для внесения образцов или реагентов;
- *избегать попадания* прямых солнечных лучей на реагенты тест-системы;
- **TMB SOLUTION** должен быть бесцветным перед использованием. Если **раствор окрашен** в синий или желтый цвет его нельзя использовать. Избегать контакта **TMB SOLUTION** с металлами или ионами металлов. Для работы использовать только чистую, тщательно вымытую дистиллированной водой посуду;

- ни в коем случае не использовать одну и ту же посуду для раствора конъюгата и **TMB SOLUTION**.

Производитель не несет ответственности за любые некорректные результаты и неблагоприятные случаи, возникшие вследствие нарушений вышеуказанных предостережений. Производитель не несет ответственности за визуальный учет результатов анализа (без использования спектрофотометра).

5.2. Техника безопасности

- все реагенты набора предназначены только для in vitro диагностики и могут использоваться только квалифицированным персоналом;
- постановку анализа проводить только в защитной одежде, одноразовых перчатках и защитных очках;
- не допускается принимать пищу, пить, курить или пользоваться косметикой в комнате выполнения теста;
- не пипетировать растворы ртом;
- положительный и отрицательный контроли не содержат компонентов человеческого происхождения;
- жидкие отходы следует инактивировать, например, раствором перекиси водорода в конечной концентрации 6% в течение 3 часов при комнатной температуре, или гипохлоритом натрия в конечной концентрации 5% в течение 30 минут, или другими разрешенными дезинфицирующими средствами;
- твердые отходы следует инактивировать путем автоклавирования при температуре 121°C в течение 1 часа;
- утилизацию инактивированных отходов проводить согласно действующему национальному законодательству;
- не автоклавировать растворы, содержащие азид натрия или гипохлорит натрия;
- некоторые компоненты тест-системы содержат низкие концентрации вредных веществ и могут вызвать раздражение кожи и слизистых оболочек. При попадании **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** и раствора конъюгата на слизистые оболочки и кожу необходимо немедленно промыть пораженное место большим количеством воды;
- в случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоту, например, сывороток, обработать поверхность дезинфицирующим средством, а затем вытереть насухо фильтровальной бумагой. В другом случае кислоту сначала необходимо нейтрализовать раствором бикарбоната натрия, а затем вытереть поверхность, как описано выше.

6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты тест-системы стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, если их хранить при 2-8°C. Не допускается замораживание тест-системы. Транспортировать набор при температуре 2-8°C. Допускается однократная транспортировка при температуре не выше 23°C в течение двух суток.

7. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы сыворотки или плазмы крови хранить при температуре 2-8°C не более 3 суток после забора. Для более длительного хранения образцы хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -70°C. Замороженные образцы перед использованием необходимо разморозить и выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. Не использовать прогретые образцы. После размораживания образцы следует перемешать для достижения однородности. Избегать повторного замораживания-оттаивания исследуемых образцов. В случае помутнения сыворотки (или плазмы) освободить образец от нерастворимых включений центрифугированием при 3000 об./мин. в течение 10-15 минут. Не использовать образцы сывороток (или плазмы) с выраженной липидемией, гемолизом, а также бактериальным ростом. На результаты анализа не влияет присутствие в образце билирубина в концентрации до 0,21 мг/мл (361,8 мкмоль/л), гемоглобина в концентрации до 10 мг/мл и триглицеридов в концентрации до 10 мг/мл (11,3 ммоль/л).

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Очень важно выдержать все реагенты тест-системы при комнатной температуре (18-25°C) в течение 30 минут перед использованием!

8.1. Подготовка ИФА-планшета

Для предупреждения конденсации воды в лунках необходимо открывать **ELISA STRIPS** только после выдерживания 30 минут при комнатной температуре. Потом раскрыть вакуумную упаковку, отделить необходимое количество лунок, а остальные сразу же тщательно упаковать с влагопоглотителем и хранить плотно закрытыми на замок (zip-lock) при температуре 2-8°C. Хранение таким образом упакованного планшета обеспечивает его стабильность в течение 3 месяцев.

8.2. Приготовление раствора для промывания

Для приготовления раствора для промывания развести концентрат [WASH TWEEN|20X] 1:20 (1+19) дистиллированной или деионизированной водой, затем перемешать. Например, 4 мл концентрата + 76 мл воды, что достаточно для 8 лунок. В случае наличия кристаллов в концентрате раствора для промывания, прогреть флакон при 37°C до полного растворения кристаллов (15-20 мин.). Разведенный раствор можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток.

8.3. Приготовление раствора конъюгата

Рабочее разведение конъюгата готовится следующим образом:

Развести [CONJUGATE|11X] (синий) в чистом флаконе [CONJUGATE DILUENT] (желтый) в соотношении 1:11 (то есть, 1+10), раствор окрашивается в зеленый цвет. Например, для 8 лунок анализа добавить в 1мл [CONJUGATE DILUENT] 100 мкл [CONJUGATE|11X]. Раствор конъюгата в рабочем разведении стабилен в течение суток при условии хранения при 2-8 °C.

9. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 9.1. Подготовить необходимое количество лунок [ELISA STRIPS] для анализа (количество исследуемых образцов и четыре лунки для контролей), вставить их в рамку ИФА-планшета. Лунки с контролями обязательно включать в каждую постановку анализа.
- 9.2. Заполнить бланк внесения проб.
- 9.3. Приготовить раствор для промывания согласно пункту 8.2.
- 9.4. Внести во все лунки планшета по 90 мкл [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 10 мкл контролей и исследуемых образцов: в лунку A1 – [CONTROL|+], в лунки B1, C1 и D1 – [CONTROL|-]. В остальные лунки - исследуемые образцы. Осторожно пипетировать смесь в лунках, не допуская пенообразования. При внесении образцов происходит изменение цвета раствора для разведения сывороток с фиолетового на синий.
- 9.6. Заклеить стрипы клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C.
- 9.7. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз с использованием автоматического промывателя или 8-канальной пипетки следующим образом:
 - удалить содержимое лунок в контейнер для жидких отходов;
 - наполнить лунки не менее чем по 300 мкл раствором для промывания, оставить не менее чем на 30 секунд;
 - аспирировать раствор из лунок, остаточный объем раствора после аспирации на всех этапах промывания должен составлять не более 5 мкл;
 - повторить процедуру промывания еще четыре раза;
 - после последней аспирации избавиться от лишней влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.
- 9.8. Приготовить раствор конъюгата согласно пункта 8.3 (в рабочем разведении 1:11).
- 9.9. В лунки внести по 100 мкл раствора конъюгата. Стрипы накрыть новой клейкой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.
- 9.10. По окончании инкубации осторожно снять клейкую пленку и промыть лунки пять раз, как описано в пункте 9.7.
- 9.11. Не касаясь дна и стенок лунок планшета, внести по 100 мкл [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.12. Инкубировать стрипы в течение 30 минут в темном месте при комнатной температуре 18-25°C. Не использовать клейкую пленку на данном этапе.
- 9.13. Для остановки ферментативной реакции внести в лунки по 100 мкл [STOP SOLUTION], придерживаясь той же последовательности, что и при внесении [TMB SOLUTION].
- 9.14. Измерить на спектрофотометре ОП в каждой лунке при длине волны 450/620-695 нм в течение 5 минут после остановки реакции. Обратит внимание на чистоту наружной поверхности дна лунок и отсутствие пузырьков.

Учет результатов анализа можно проводить в одноволновом режиме при длине волны 450 нм, в этом случае следует оставить лунку для установления бланка (в такую лунку вносить только [TMB SOLUTION] и [STOP SOLUTION]).

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

10.1. Учет результатов анализа

Рассчитать среднее значение ОП отрицательного контроля (Nc), уровень граничного значения (Cut off - CO) и индекс позитивности образца (IP_{sample}),

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = Nc + 0.3;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO; \quad \text{где } OD_{sample} - \text{ОП образца}$$

10.2. Достоверность результатов анализа

Данные теста считаются достоверными, если они отвечают следующим требованиям:

CONTROL +	$OD \geq 1.2$
CONTROL -	$OD \leq 0.150$
CONTROL -	$Nc \times 0.5 \leq Ncn \leq Nc \times 2.0$

Если одно из значений ОП отрицательного контроля выходит за пределы указанного выше интервала, его отбрасывают и рассчитывают среднее Nc по остальным значениям ОП отрицательного контроля. Если более одного из значений ОП отрицательного контроля не отвечают указанным требованиям, то тест считается некорректным и требует повторного анализа.

10.3. Интерпретация результатов

$IP_{sample} > 1.1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0.9 \leq IP_{sample} \leq 1.1$	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ*
$IP_{sample} < 0.9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

*Неопределенные образцы рекомендуется исследовать повторно. Если результаты снова будут в пределах неопределенных, следует произвести забор нового образца.

Интерпретация результатов определения антител, специфических к антигенам вируса Эпштейна-Барр

Наличие антител к антигенам ВЭБ			Интерпретация результата
анти-VCA-IgM	анти-VCA-IgG	анти-EBNA-IgG	
Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют	Инкубационный период или отсутствие инфекции
Выявляются	Отсутствуют	Отсутствуют	Вероятно ранняя стадия инфекции*
Отсутствуют	Выявляются	Отсутствуют	Данный серологический профиль может соответствовать паст-инфекции, однако недавняя инфекция не может быть исключена *
Выявляются	Выявляются	Отсутствуют	Острая инфекция
Выявляются	Выявляются	Выявляются	Профиль сложно интерпретировать. Он может отображать позднюю первичную инфекцию или реактивацию, однако нельзя исключить ложноположительный результат выявления IgM
Отсутствуют	Выявляются	Выявляются	Паст-инфекция

* рекомендуется повторное обследование пациента через 2-3 недели

11. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

11.1. Специфичность и чувствительность

В сравнительных исследованиях тест-системы «Vitrotest EBV VCA-IgM» с другой коммерческой тест-системой, имеющей CE маркировку, были проанализированы 102 сыворотки, содержащие антитела класса IgM к капсидного антигену вируса Эпштейна-Барр, и 124 сыворотки, не содержащие серологических маркеров ВЭБ-инфекции. Относительная чувствительность тест-системы «Vitrotest EBV VCA-IgM» составила 99,0%, относительная специфичность - 99,2%.

11.2. Точность

Повторяемость результатов в пределах одной постановки анализа (Intra assay repeatability)

Коэффициент вариации (CV) для 2 сывороток с разным уровнем специфических антител класса IgM к VCA ВЭБ оценивали в 32 повторях на одной серии тест-системы.

№ сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
1100	1,468	4,42	6,9
1843	0,753	2,27	6,0

Воспроизводимость результатов между различными постановками анализа (Inter assay reproducibility)
 Коэффициент вариации (CV) для 2 сывороток с разным уровнем специфических антител оценивали в течение 4 дней в 4 постановках анализа, по 8 повторов в каждом анализе.

N° сыворотки	OD _{ср}	IP _{ср}	CV, %
1100	1,533	4,65	6,4
1843	0,806	2,44	6,1

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Положительный результат в тест-системе «Vitrotest EBV VCA-IgM» является свидетельством наличия у пациента антител класса IgM, специфичных к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр. Антитела класса IgM, специфичные к VCA, присутствуют при острой вирусной инфекции Эпштейна-Барр. Не всегда антитела этого класса являются доказательством первичной инфекции, при реактивации также могут синтезироваться специфические антитела класса IgM.

Нельзя полностью исключить перекрестные реакции с антителами класса IgM к цитомегаловирусу, поскольку оба герпесвирусы имеют похожие антигенные детерминанты. Для исключения ложноположительных результатов рекомендуется исследовать серологический профиль в динамике (CMV IgG, CMV IgM, VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG), а также применять методы выявления ДНК вируса в биологическом материале пациента и учитывать клиническую картину заболевания.

Если образец получен через небольшой промежуток времени после инфицирования, то антитела класса IgM могут не определяться. При наличии клинических симптомов необходимо провести повторное тестирование пациента через 2-4 недели.

С осторожностью следует интерпретировать результаты, полученные для пациентов с иммуносупрессией.

Для постановки диагноза следует учитывать как результаты лабораторных исследований, так и клинические проявления заболевания.

13. ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ВОЗНИКНУТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИФА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

<i>Возможные причины</i>	<i>Способы устранения проблем</i>
<i>Высокий фон в лунках всего планшета</i>	
Загрязненный промыватель	Прочистить головку промывателя и промыть 30% раствором этилового спирта, затем дистиллированной водой
Низкое качество или загрязненность воды	Использовать очищенную воду с удельным сопротивлением ≥ 10 МΩ·см.
Использование плохо вымытой посуды	Использовать химически чистую посуду
Использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор	Не использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства
Использование загрязненных наконечников	Использовать новые наконечники
Увеличено время инкубации или изменен температурный режим	Придерживаться режима инкубации согласно инструкции по применению
<i>Высокий фон в отдельных рядах</i>	
Повторное внесение раствора ТМБ	Раствор ТМБ вносить один раз
Загрязнение конуса автоматической пипетки раствором конъюгата	Прочистить пипетку и осторожно набирать раствор
Загрязнен один из каналов промывателя	Прочистить канал промывателя, промыть вошер
<i>Значение ОП положительного контроля ниже установленной границы</i>	
Неправильно приготовлен или не внесен один из реагентов (конъюгат или раствор ТМБ)	Повторно провести ИФА, обратить внимание на приготовление этих реагентов
Сокращено время инкубации на одном из этапов	Проводить инкубацию согласно инструкции по применению

ЛИТЕРАТУРА

1. Возбудители вирусных инфекций человека. // Медицинская микробиология. / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Позеев – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 745-822.
2. Возіанова Ж.І. Інфекційні і паразитарні хвороби: В 3 т. – К: Здоров'я, 2001.
3. Hess R.D. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years.// J. Clin.Microbiol. – 2004. – V.42, No.8 – P. 3381-3387.
4. Lennette, E.T. Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infections, In E.H. Lennette (ed.), Laboratory Diagnosis of Viral Infections. - Dekker Publishing, New York, 1985. - P.257-271.
5. Lennette, E.T. Epstein-Barr Virus, In P.R. Murray (ed.), Manual of Clinical Microbiology. - ASM Press Publishing, Washington, D.C., 1995. - P.905-910.
6. Sumaya, C.V., Jenson, H.B. Epstein-Barr Virus, In N.R. Rose (ed.), Manual of Clinical Laboratory Immunology. - ASM Press Publishing, Washington, D. C., 1992. - P.568-575.
7. Roubalova,K., Roubal, J., Skopovy, P., et. al. Antibody Responses to Epstein-Barr Antigens in Patients with Chronic Viral Infection. // Journal of Medical Virology. - 1988. - 25(1) - P. 115-122.
8. Khanna R., Burrows S.R., Moss D. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1995. – V. 59. – P. 387-405.
9. Gartner B.C., Hess R. D., Bandt D., Kruse A., Rethwilm A., et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2003. – V. 10. – P. 78–82.
10. UK Standards for Microbiology Investigations. Epstein-Barr Virus Serology. // Virology. - V 26, N° 5. - P. 11.

ГРАФИЧЕСКИЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ



Номер по каталогу



Обратитесь к инструкции по применению



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Производитель



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

Содержимого достаточно для (n-) количества тестов



Знак соответствия техническим регламентам



Температурный диапазон



Код партии



Использовать до



Дата изготовления



Не допускать воздействия солнечного света



Уполномоченный представитель в ЕС

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_EBV_VCA-IgM_TK052_V04
Редакция 4 от 17.06.2021г.

С вопросами и пожеланиями по работе набора обращайтесь к производителю:



ООО "Витротест Биореагент", ул. Бойчука М. 18Б, 56, г. Киев, 01103, Украина, tel.: +38(097)222-76-72, +38(044)222-76-72, e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



Vitrotest Europe Sp. z O.O.
ul.Krakowska 139-155, 50-428, Wrocław, Poland
tel.: +48-88-2950379,
e-mail: info@vitrotest.pl, www.vitrotest.pl



Vitrotest® EBV VCA-IgM

СХЕМА АНАЛИЗА



Выдержать все реагенты не менее 30 минут при 18-25°C перед использованием



Внести по 90µl **SAMPLE DILUENT** в лунки стрипов (фиолетовый цвет)



Внести по 10µl контролей и образцов в лунки:

A1 – **CONTROL +**,

B1, C1, D1 – **CONTROL -**,

E1 и остальные лунки – исследуемые образцы (цвет меняется с фиолетового на синий)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 (300µl в лунку)



Внести по 100µl раствора конъюгата (в рабочем разведении 1:11) в каждую лунку (зелёный цвет)



Заклеить стрипы пленкой, инкубировать 30 минут при 37°C



Промыть лунки 5 раз разведённым 1:20 (1+19) раствором для промывания Tw20 (300µl в лунку)



Внести по 100 µl **TMB SOLUTION** в каждую лунку



Инкубировать 30 минут в тёмном месте при 18-25°C



Остановить реакцию внесением по 100µl **STOP SOLUTION** (цвет меняется с синего на жёлтый)



Определить оптическую плотность (OD) при 450/620-695nm

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3)/3;$$

$$CO = Nc + 0.3; \quad IP_{sample} = OD_{sample} / CO;$$

Nc - среднее значение ОП 3 **CONTROL -**;
CO - граничное значение,
IP_{sample} - индекс позитивности

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

$IP_{sample} > 1.1$	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
$0.9 \leq IP_{sample} \leq 1.1$	НЕОПРЕДЕЛЁННЫЙ
$IP_{sample} < 0.9$	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ

Vitrotest Helicobacter pylori IgA

ELISA test kit for the qualitative and semiquantitative determination of IgA class antibodies to *Helicobacter pylori*

REF ELO99-96

IVD

Σ 96

1. INTENDED USE

The test kit Vitrotest *Helicobacter pylori* IgA is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative and semiquantitative determination of IgA antibodies to *Helicobacter pylori* in human serum or plasma.

The test kit might be applied for the ELISA using both automatic pipettes and standard equipment as well as open system automated ELISA analyzers.

2. CLINICAL VALUE

Helicobacter pylori is a widespread microorganism infecting half of the world's population. Its prevalence is very high in developing countries and is quite low in the developed world. According to the World Gastroenterology Organization, infection of adults in Eastern Europe and Asia is 70-80%.

Studies during recent decades have shown the key role of bacterium *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of stomach and duodenal lesions. *H. pylori* is detected almost in 100 % of adult patients with duodenal ulcer, approximately in 80 % of patients with peptic ulcer, in 92 % of patients with gastric cancer and in 92 % of patients with active chronic gastritis. Research has demonstrated that elimination of helicobacter leads to the disappearance of gastritis and significant reduction in the incidence of duodenal ulcer recurrence.

Helicobacteriosis is a chronic infection with long, often asymptomatic course. Its symptoms do not differ from clinical manifestations of gastro-duodenitis since usual constant pain in the epigastrium occurs. *H. pylori* is often present in patients with no clinical manifestations of disease.

H. pylori strains are extremely heterogeneous and divided into two groups: strains that express both antigens VacA and CagA (type I) and strains that do not express these antigens (type II). Strains of the first group dominate in patients with peptic ulcer disease and gastric cancer. CagA protein penetrates the epithelial cells of the mucous membrane, causes abnormal mitosis and induces chromosome instability. Organism infected with expressing CagA *H. pylori* produces antibodies, which are specific for CagA. Antibodies to CagA protein are found in 80-100 % of patients with duodenal ulcer and in 94 % of patients with gastric cancer. Thus, detection of the antibodies to CagA protein is an informative marker in the diagnosis of duodenal ulcer and gastric cancer.

Strains of *H. pylori* II type which do not express antigens CagA and VacA are associated with severe gastric and duodenal ulcers, particularly peptic ulcer disease and cancer.

H. pylori infection of the patient can be identified with both invasive and non-invasive diagnostic methods. Invasive methods include bioptic studies of the gastrointestinal tract mucosa with histological or culture methods or a rapid urease test. However, heterogeneous spread of *H. pylori* in tissues often leads to false-negative results. Non-invasive diagnostic methods include serologic studies of patient sera for the presence of specific antibodies to *H. pylori* and respiratory urease test using radioactively labeled urea. ELISA for the detection of specific IgG/IgA/IgM antibodies is the least invasive, rapid, highly sensitive and informative method for the diagnosis of *H. pylori* infection.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Determination of IgA antibodies to *H. pylori* in the test kit Vitrotest *Helicobacter pylori* IgA is based on a solid phase, indirect ELISA in a two-step incubation procedure. Microwells are coated a mixture of recombinant and native *H. pylori* antigens. During the first incubation step, the specific antibodies to *H. pylori*, if present in the sample, will be bound to the solid phase precoated antigens. The wells are washed to remove unbound antibodies. A secondary antibody (anti-IgA), which is conjugated to horseradish peroxidase (HRP), is added next and binds to the immune complexes on the solid phase. Unbound components are removed by washing. Antigen-antibody complexes are revealed by addition of chromogen solution containing 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide. After 15 minutes the reaction has been stopped, the absorbance values are read using a spectrophotometer at 450/620-695 nm. The colour intensity is proportional to the amount of the antibodies present in the sample.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT

4.1. Composition of the test kit

ELISA STRIPS	1x96 wells	Microplate (12 strips x 8 wells) Each well is coated with a mixture of recombinant and native <i>H. pylori</i> antigens. The wells can be separated.
CONTROL +	1x0.5 ml	Positive control Solution of specific monoclonal immunoglobulins with preservative (pink).

CONTROL –	1x0.5 ml	Negative control Buffer solution with detergent and preservative (yellow).
CONTROL CUT-OFF	1x0.5 ml	Cut-off control Solution of specific monoclonal immunoglobulins with preservative (orange).
SAMPLE DILUENT	1x12 ml	Sample diluent Buffer solution with detergent and preservative (brown-green).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Conjugate solution Buffer solution of monoclonal antibodies to human IgA conjugated to HRP with stabilizers and preservative (orange), ready to use.
TMB SOLUTION	1x12 ml	TMB solution TMB, H ₂ O ₂ , stabilizers, preservative (colourless), ready to use.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Washing solution Tw20 (20x concentrate) 20X concentrated of PBS buffer with Tween-20 and NaCl (colourless)
STOP SOLUTION	1x12 ml	Stop Solution 0.5 mol/l H ₂ SO ₄ (colourless), ready to use.

Adhesive films (2), sera identification plan (1), instruction for use and certificate of analysis.

4.2. Material required but not provided

- variable volume automatic pipettes (10 µl–1000 µl) and disposable pipette tips;
- plate reader (single wavelength 450 nm or dual wavelength 450/620–695 nm);
- volumetric laboratory glassware (10–1000 ml);
- distilled/DI water;
- incubator thermostatically controlled at 37 °C;
- automatic/semiautomatic plate washer;
- appropriate waste containers for potentially contaminated materials;
- timer;
- absorbent paper;
- disposable gloves;
- disinfectants;
- protective clothes.

5. PRECAUTIONS AND SAFETY

5.1. Precautions

The ELISA assays are time and temperature sensitive. Strictly follow the test procedure and do not modify it.

- do not use expired reagents;
- do not use for analyses and do not mix reagents from different lots or from test kits of different nosology as well as other manufacturer's reagents with Vitrotest kits;

*Note: it is possible to use **WASH TWEEN 20X**, **TMB SOLUTION** and **STOP SOLUTION** from other Vitrotest ELISA kits.*

- close reagents after use only with appropriate caps;
- control the filling and full aspiration of the solution in the wells;
- use a new tip for each sample and reagent;
- avoid exposure of kit reagents to direct sunlight;
- **TMB SOLUTION** must be colourless before use. If **TMB SOLUTION** is blue or yellow it cannot be used. Avoid any contact of **TMB SOLUTION** with metals or metal ions. Use glassware thoroughly washed and rinsed with distilled/DI water;
- never use the same glassware for **CONJUGATE SOLUTION** and **TMB SOLUTION**.

The manufacturer is not responsible or liable for any incorrect results and/or incidents taking place as a result of any violation of the instruction. The manufacturer is not responsible for visual readings of samples (without using a plate reader).

5.2. Safety

- all components of test kit are intended for *in vitro* diagnostic use only;
- all materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious;
- the ELISA is only designed for qualified personnel;

- disposable gloves and safety glasses must be worn at all times while performing analysis;
- never eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory;
- never pipette solutions by mouth;
- controls do not contain of human origin components;
- avoid contact with [STOP SOLUTION] containing 0.5 mol/l H_2SO_4 . It may cause skin irritation and burns;
- some components of the test kit contain low concentrations of harmful compounds and could cause irritation of the skin and the mucosa. In the case of contact of [TMB SOLUTION], [STOP SOLUTION] or [CONJUGATE SOLUTION] with skin or mucosa, the place of contact should be immediately rinsed with large amounts of water;
- in case of spilling of solutions that do not contain acid, e.g. sera, rinse the surface with disinfectant, then dry it with absorbent paper. In other case acid first must be neutralized by sodium bicarbonate and then wiped out as described above;
- for information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request.

5.3. Waste treatment

Patient specimens, controls, and incubated microplate strips should be treated as infectious waste, residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

6. STORAGE AND STABILITY

Reagents are stable until stated expiration date on the label when stored refrigerated (2-8°C). Do not freeze. The kit should be shipped at 2-8°C. Single transportation at the temperature up to 23°C for two days is possible.

After the first opening of the packaging, the components of the ELISA kits are stable within 3 months, except for those specified in p. 8 of this Instruction.

7. SPECIMEN COLLECTION

The fresh serum or plasma (EDTA, lithium-heparin, sodium citrate, potassium fluoride) samples can be stored for 3 days at 2-8 °C, or frozen for longer periods at -20 – -70 °C. Frozen samples must be thawed and kept at room temperature for at least 30 min before use. Do not use preheated samples. Mix thawed samples thoroughly to homogeneity. Avoid repeated freezing/thawing. Samples containing aggregates must be clarified by centrifugation (3000 rpm for 10-15 min). Do not use hyperlipemic, hyperhaemolysed or contaminated by microorganisms serum specimens. The presence of bilirubin up to concentration of 0.21 mg/ml (361.8 µmol/l), haemoglobin up to concentration of 10 mg/ml and triglycerides up to concentration of 10 mg/ml (11.3 mmol/l) are allowed.

8. REAGENT PREPARATION

It is very important to keep all test components for at least 30 min at room temperature (18-25 °C) before the assay!

8.1. [ELISA STRIPS] preparation

Before opening the bag with the [ELISA STRIPS], keep it at room temperature for 30 minutes to avoid water condensation inside the wells. Open the vacuum bag and take out the necessary number of wells. Once opened, the bag with the remaining strips and desiccant must be **resealed with the zip-lock** immediately and kept refrigerated at 2-8°C for no more than 3 months.

8.2. Washing solution preparation

Check the [WASH TWEEN 20X] for the presence of salt crystals. If crystals have formed, re-solubilise them by warming the vial at 37°C, until crystals have been fully dissolved (15-20 min). Dilute the [WASH TWEEN 20X] 1:20 (1+19) with distilled/DI water before use. For example, 4ml concentrate + 76 ml water is sufficient for 8 wells. Once diluted it is stable at 2-8°C for 7 days.

9. ASSAY PROCEDURE

- Take out from the protective bag the support frame and the necessary number of the wells [ELISA STRIPS] (the number of specimens + 4 for controls). Place the wells into the frame. Wells with the controls must be included in every test.
- Complete the sera identification plan.
- Prepare washing solution (see 8.2.).
- Dispense 90 µl of [SAMPLE DILUENT] into each well.
- Dispense 10 µl of controls and patient samples into the wells in the following order: A1 – [CONTROL +], B1, C1 – [CONTROL CUT-OFF], and D1 – [CONTROL -], other wells – patient samples. Mix gently to avoid foaming. The colour of the sample diluent changes from brown-green to blue.
- Cover strips with an adhesive film and incubate for 30 min at 37°C.

- 9.7 Remove and discard the adhesive film and wash all wells 5 times with automatic washer or 8-channel pipette as follows:
- aspirate the contents of all wells into a liquid waste container and add immediately a minimum of 300 µl of diluted Washing solution to each well;
 - soak each well for 30 seconds between each wash cycle;
 - aspirate again. The residual volume must be lower than 5µl.
 - repeat the washing step 4 times;
 - after the final washing cycle, turn down the plate onto an absorbent paper and tap it to remove any residual buffer.
- 9.8 Dispense 100 µl of [CONJUGATE SOLUTION] per well. Cover strips with a new adhesive film, incubate for 30 min at 37°C.
- 9.9 Remove and discard the adhesive film and wash all wells five times as described above (see 9.7).
- 9.10 Dispense 100 µl [TMB SOLUTION] into all wells. Do not touch the walls and bottoms of the wells to avoid contamination.
- 9.11 Incubate the strips for 15 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark. Do not use adhesive film in this step.
- 9.12 Add 100 µl [STOP SOLUTION] to each well in the same order and at the same rate as for [TMB SOLUTION].
- 9.13 Read the optical density (OD) of the wells at 450/620-695 nm using a microplate reader within 5 minutes after adding the [STOP SOLUTION]. Pay attention to the cleanness of the plate bottom and absence of bubbles in the wells before reading.
- Measurement in the single-wave procedure at 450 nm is possible. Reserve blank well to adjust spectrophotometer in such analysis. Only [TMB SOLUTION] and [STOP SOLUTION] must be added in blank well).*

10. CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

10.1. Validation of the test

The test run may be considered valid provided the following criteria are met:

[CONTROL +]	OD ≥ 1.2
[CONTROL CUT-OFF]	OD in a range 0.25-0.65
[CONTROL -]	OD ≤ 0.150

If one of the control cut-off absorbances does not match the above criteria, this value should be discarded and a mean value should be calculated using the remaining cut-off value. If both control cut-off absorbance do not meet the criteria, the test is invalid and must be re-tested.

10.2. Calculation of results

The cut-off (CO) is the mean optical density (OD) of the wells containing [CONTROL CUT-OFF]:

$$CO = (OD_{\text{CONTROL CUT-OFF } 1} + OD_{\text{CONTROL CUT-OFF } 2})/2;$$

The sample result is reported as a Ratio:

$$\text{Ratio}_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}} / CO, \quad OD_{\text{sample}} - \text{optical density of the well containing sample}$$

10.3. Interpretation of results

Ratio _{sample} > 1.1	POSITIVE
0.9 ≤ Ratio _{sample} ≤ 1.1	DOUBTFUL*
Ratio _{sample} < 0.9	NEGATIVE

* If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Specificity and sensitivity

Sensitivity of the test kit Vitrotest Helicobacter pylori IgA was evaluated using 20 sera which contain IgG antibodies to *H. pylori*. In the test kit Vitrotest Helicobacter pylori IgA among IgG positive sera 17 samples were identified as positive. The data obtained were confirmed by an CE-marked enzyme immunoassay for the detection of IgA antibodies against *H. pylori*. In the test kit Vitrotest Helicobacter pylori IgA sensitivity was 85%.

In the study of 23 negative for antibodies to *H. pylori* sera, specificity rate of the test kit Vitrotest Helicobacter pylori IgA was above 91.3%.

11.2. Accuracy

Intra assay repeatability

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 2 samples with various specific antibody levels in 32-replicate determinations using 1 lot of the test kit.

Serum No.	OD	Ratio	CV, %
H3	0.917	2.94	7.5
H4	0.526	1.69	5.1

Inter assay reproducibility

Coefficient of variation (CV) was calculated by measuring 2 samples with various specific antibody levels in 4 ELISA performances during 4 days, in 8-replicate determinations.

Serum No.	OD	Ratio	CV, %
H3	0.851	2.73	7.4
H4	0.529	1.70	5.7

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A positive result in the test kit Vitrotest *Helicobacter pylori* IgA indicates the presence of specific antibodies IgA to *H. pylori*.

A negative result in the test kit Vitrotest *Helicobacter pylori* IgA indicates the absence in serum of IgA antibodies specific to *H. pylori*.

For a comprehensive serological diagnosis of *H. pylori*-infection it is recommended to test the samples for the presence IgG specific antibodies to *H. pylori* using, for example, test kit Vitrotest *Helicobacter pylori* IgG.

It should be noted that in case of early *H. pylori* infection the result may be negative due to the absence or low concentration of antibodies. In the presence of clinical manifestations of the disease it is recommended to repeat the test at least in two weeks.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis, in fact, should take into consideration as well as clinical history, symptomatology and serological data.

13. TROUBLESHOOTING

Possible causes	Solutions
<i>High background in all wells</i>	
Contaminated washer	Clean the washer head, then rinse it with 30% ethanol and distilled water
Low quality water or contaminated water	Use distilled/DI with resistivity $\geq 10 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$.
Using contaminated glassware	Use clean glassware
Using chlorine based disinfectants	Use disinfectants without chlorine
Using contaminated tips	Use new tips
Increased time of incubation or temperature regimen was changed	Follow incubation regimen according to instruction for use
<i>High background in a few wells</i>	
TMB solution was added more than once	Add TMB solution once
Pipette shaft was contaminated with conjugate solution	Clean the pipette; pipette the liquids carefully
One the channels of the washer was contaminated	Clean the washer channel, clean the washer
<i>OD of the positive control below normal</i>	
Conjugate solution/tmb solution was prepared improperly or not added	Run ELISA repeatedly, prepare conjugate solution / TMB solution properly

Reduced incubation time in one of the stages

Follow incubation regimen according to the instruction for use

Visual colour intensity of the wells does not correspond to optical density

The optical beam or another component of the reader is misaligned or malfunctioning

Test the absorbance reader's performance

REFERENCE

1. Bermejo F., Boixeda D., Gisbert J.P. et al. Concordance between noninvasive tests in detecting *Helicobacter pylori* and potential use of serology for monitoring eradication in gastric ulcer // J Clin Gastroenterol. – 2000. – V.31 N.2 – P.137-41.
2. Holtmann G., Talley N.J., Mitchell H., Hazell S. Antibody response to specific *H. pylori* antigens in functional dyspepsia, duodenal ulcer disease, and health // Am. J. Gastroenterol. – 1998. – Vol.93 N.8 – P.1222-1227.
3. Klaamas K., Held M., Wadström T., Lipping A., Kurtenkov O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. // Int. J. Cancer. – 1996 – Vol.67, N.1 – P.1-5.
4. Kosunen T.U., Seppälä K., Sarna S. Association of *Helicobacter pylori* IgA antibodies with the risk of peptic ulcer disease and gastric cancer // World J Gastroenterol. – 2005. – V.11, N.43 – P.6871-6874.
5. Kosunen T.U., Seppälä K., Sarna S., Sipponen P. // Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. - Lancet. – 1992. – V.339 N.8798 – P.893-895.
6. Timo U, Kosunen, Eero Pukkala, Seppo Sarna et al. Gastric cancers in Finnish patients after cure of *Helicobacter pylori* infection: a cohort study // Int. J. Cancer. - 2011. - V.128, N.2 - P.433-439.



Catalogue number



Consult instructions for use



In vitro diagnostic medical device



Manufacturer



Caution



Contains sufficient for $<n>$ tests



Temperature limit



Batch code



Use-by date



Date of manufacture



Keep away from sunlight



Signifies European conformity (CE) mark

Inst_ Helicobacter_pylori_IgA_EL099-96_V01_ENG
Edition 1st, 21.02.2022



Vitrotest Europe Sp. z o.o.
Krakowska str., 139-155, 50-428, Wrocław, Poland
tel.: +48 882 950 379,
e-mail: info@vitrotest.pl, www.vitrotest.pl



Vitrotest Helicobacter pylori IgA

ASSAY PROCEDURE



Keep all reagents and specimens for at least 30 min at 18-25 °C before use



Dispense 90 µl of [SAMPLE DILUENT] into the wells
(brown-green colour)



Dispense 10 µl of controls and samples into the wells in the following order:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1 – [CONTROL CUT-OFF],

D1 – [CONTROL -],

E1 and other wells – patient samples

(colour changes from brown-green to blue)



Cover wells with an adhesive film, incubate for 30 min at 37 °C



Rinse the wells 5 times with diluted 1:20 (1+19) washing solution Tween-20
(300 µl per well)



Add 100µl of [CONJUGATE SOLUTION] into the wells
(orange colour)



Cover wells with an adhesive film, incubate for 30 min at 37 °C



Rinse the wells 5 times with diluted 1:20 (1+19) washing solution Tween-20
(300 µl per well)



Add 100 µl of [TMB SOLUTION] into the wells



Incubate for 15 min in the dark at 18-25 °C



Add 100 µl of [STOP SOLUTION]
(colour changes from blue to yellow)



Determine the optical density (OD) at 450/620-695 nm

CALCULATION

$$CO = (OD_{\text{CONTROL CUT-OFF 1}} + OD_{\text{CONTROL CUT-OFF 2}})/2;$$

$$\text{Ratio}_{\text{sample}} = OD_{\text{sample}}/CO$$

INTERPRETATION

Ratio _{sample} > 1.1	POSITIVE
0.9 ≤ Ratio _{sample} ≤ 1.1	DOUBTFUL
Ratio _{sample} < 0.9	NEGATIVE



Instruction for use



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
IgG АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ
HELICOBACTER PYLORI
В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ**

«Helicobacter pylori IgG-ИФА»

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ REF **K119**

ТУ № 9398-119-18619450-2012

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
№ ФСР 2012/14171 от 21 декабря 2012 г.

Антитела к ВИЧ 1,2, вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют
Контрольные сыворотки, входящие в состав набора, инактивированы.



На 96, 192 или 480 определений



Для *in vitro* диагностики



ООО "ХЕМА"

105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48

+7(495) 510-57-07

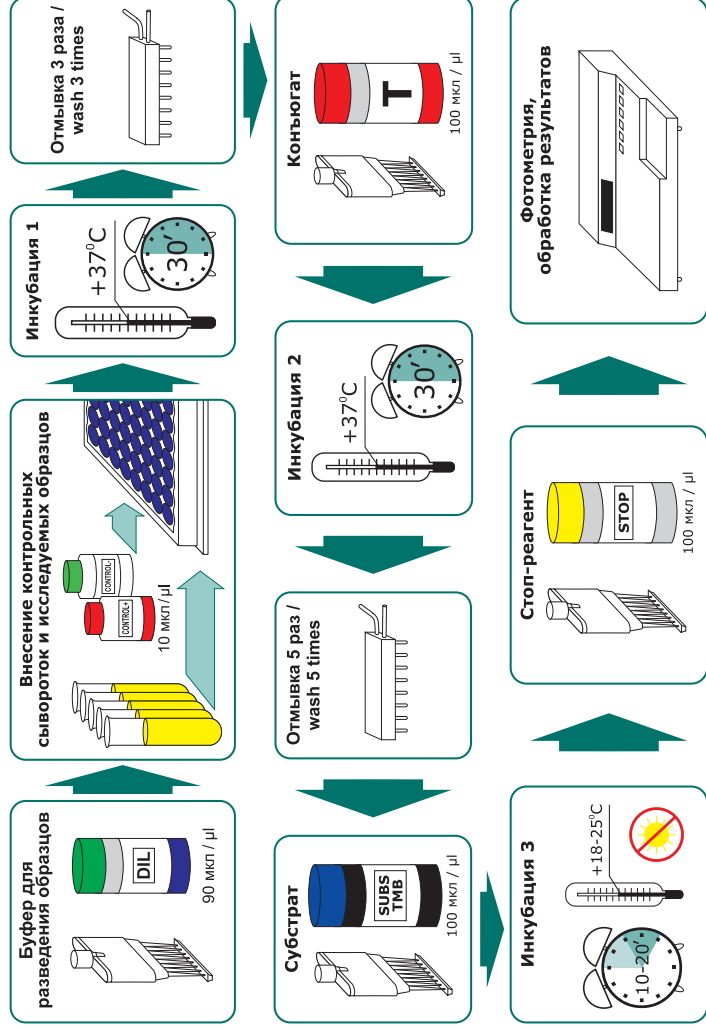
redkin@xema-medica.com

www.xema-medica.com



Authorized Representative in EU:
Polmed.de
Steinacker 20, D-73773
Aichwald, Germany
e-mail: info@polmed.de

Схема проведения анализа / Test procedure



K119

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
4. СОСТАВ НАБОРА	5
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	6
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	6
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	7
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	8
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	9
11. ЛИТЕРАТУРА	11

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ *HELICOBACTER PYLORI* В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА» предназначен для качественного определения концентрации IgG антител к антигенам *Helicobacter pylori* в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. *H.pylori* – широко распространенный микроорганизм, которым инфицирована половина населения земного шара. Его распространенность чрезвычайно высока в развивающихся странах и достаточно низка в развитых странах мира. По данным Всемирной организации гастроэнтерологов, в странах Восточной Европы и Азии инфицированность взрослого населения составляет 70–80 %.

Исследования последних десятилетий показали ведущую роль бактерии *H. pylori* в патогенезе поражений желудка и двенадцатиперстной кишки. *H.pylori* обнаруживают почти у 100 % взрослых пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, примерно у 80 % больных язвенной болезнью желудка, у 92 % больных раком желудка и у 92 % больных с активным хроническим гастритом. Исследованиями доказано, что элиминация хеликобактера приводит к исчезновению гастрита и значительно уменьшает частоту рецидивов язвы двенадцатиперстной кишки.

1.3. Хеликобактериоз – хроническая инфекция с длительным, часто бессимптомным течением. В случае возникновения симптомы не отличаются от клинических проявлений гастродуоденита (обычно – постоянные боли в области эпигастрия). *H.pylori* очень часто присутствует у пациентов, не имеющих клинических проявлений заболевания.

1.4. Штаммы *H.pylori* чрезвычайно гетерогенны и разделяются на две большие группы – штаммы, экспрессирующие антигены VacA и CagA (тип I), и штаммы, которые не экспрессируют эти антигены (тип II). Штаммы первой группы доминируют у пациентов с язвенной болезнью и раком желудка. Белок CagA проникает в клетки эпителия слизистой оболочки, приводит к нарушению митоза и индуцирует хромосомную нестабильность. Если инфекция вызвана штаммами *H. pylori*, экспрессирующими белок CagA, в организме человека вырабатываются антитела специфичные к этому антигену. Антитела к белкам CagA выявляются у 80–100 % пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и у 94 % больных раком желудка. Поэтому выявление антител, специфичных к белку CagA, является информативным маркером в диагностике язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и рака желудка.

1.5. Штаммы *H.pylori* II типа, которые не экспрессируют антигены CagA и VacA, не ассоциируются с тяжелыми поражениями желудка и двенадцатиперстной кишки, в частности, язвенной болезнью и раком.

1.6. Инфекция *H.pylori* может быть обнаружена как инвазивными, так и неинвазивными диагностическими методами. Инвазивные методы включают исследование биоптатов слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта гистологическими, культуральными методами или быстрым уреазным тестом, однако, неоднородное распространение *H.pylori* по слизистой часто приводит к ложноотрицательным результатам. К неинвазивным методам диагностики относятся серологические исследования сыворотки пациента на наличие специфических к *H.pylori* антител и дыхательный уреазный тест с применением радиоактивно меченой мочевины. Иммуоферментный анализ на выявление специфических антител классов IgG/IgA/IgM является минимально инвазивным, быстрым, высокочувствительным и информативным методом диагностики инфекции *H.pylori*.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG антител к антигенам *Helicobacter pylori* основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуоферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован рекомбинантный белок CagA *H.pylori*. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата – мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию специфических IgG антител к антигенам *Helicobacter pylori*. Индекс позитивности (ИП, %) IgG антител к антигенам *Helicobacter pylori* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность и специфичность.

Чувствительность Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА» оценивали с помощью панели охарактеризованных сывороток, которая состоит из 42 образцов сывороток крови человека, содержащих антитела класса IgG к *H. pylori*. В Наборе реагентов «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА» все сыворотки были определены как положительные. При исследовании 158 отрицательных на антитела к *H. pylori* сывороток показатель специфичности составил более 98%.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG антител к антигенам *Helicobacter pylori* в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА» не превышает 8.0%.

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА» (Intra-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %	CV2, %
1	32	3.4	2.9	2.8
2	32	9.1	4.8	5.0

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %
1	8	3.1	3.9
2	8	9.0	6.2

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P119Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN119Z CP119Z	CONTROL - CONTROL+	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроль) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG антител к антигенам Helicobacter pylori, готовы к использованию (0.5 мл и 0.2 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T119Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
4	S011Z	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
5	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
9	K119I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «Helicobacter pylori IgG-ИФА»	1	шт	-
10	K119Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Helicobacter pylori IgG-ИФА»	1	шт	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «*Helicobacter pylori* IgG-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- Буфер для разведения образцов, конъюгат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.7. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка).
2	Внесите во все лунки планшета по 90 мкл ИФА-Буфер.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
4	ВНИМАНИЕ! При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметил-бензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

13 Рассчитайте содержание антител к антигенам в исследуемых образцах. Для этого:

1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:

$$\text{ОП (CN119)Ср} = (\text{ОП1 (CN119)} + \text{ОП2 (CN119)} + \text{ОП3 (CN119)}) / 3;$$

Результаты анализа считать достоверными, если:

- ОП **Положительного контроля** не ниже **0.6 оптических единиц (ОЕ)**;
- ОП **Отрицательного контроля** не выше **0.15 ОЕ** во всех лунках;
- ОП каждого значения Отрицательного контроля отличается не более чем в два раза от среднего значения отрицательного контроля, т.е. $\text{ОП (CN119)Ср} \times 0.5 < \text{ОПn (CN119)} < \text{ОП (CN119)Ср} \times 2.0$;

если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете ОП (CN119)Ср.

2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.3

$$\text{Cut off} = \text{ОП (CN119)Ср} + 0.3$$

3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off

$$\text{ИП} = \text{ОП образца} / \text{Cut off}$$

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

При $\text{ИП} > 1.1$ образец положительный,
при $\text{ИП} < 0.9$ – отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-). Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными. При интерпретации результатов исследований детских сывороток уровень граничного значения должен быть пониженным на 10%.

Результат исследования детских сывороток		Результат исследования сывороток взрослых	
ИП образца > 0.9	положительный	ИП образца > 1.1	положительный
$0.8 \leq \text{ИП образца} \leq 0.9$	неопределенный	$0.9 \leq \text{ИП образца} \leq 1.1$	неопределенный
ИП образца < 0.8	отрицательный	ИП образца < 0.9	отрицательный

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в парных сыворотках крови. ИП в пределах 1.1–7.0 пропорционален содержанию специфических антител класса IgG. Это позволяет проводить исследование парных сывороток полученных от пациентов с интервалом в 2–4 недели.

Если ИП образца составляет выше 7.0 для корректной оценки относительно содержания специфических антител, рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разведенного раствором для разведения сывороток в 10 раз, при определении индекса позитивности в таком случае следует умножить полученное значение ИП на 10.

Такой способ интерпретации результатов анализа позволяет сравнивать уровень специфических антител к *H. pylori* в динамике.

**Интерпретация результатов определения антител классов IgG,
IgA и IgM специфичных к белку CagA *H.pylori***

Результат определения антител к белку CagA <i>H.pylori</i>			Интерпретация результата
IgG*	IgA**	IgM	
Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Образец не содержит специфических антител к CagA <i>H.pylori</i> , либо их концентрация ниже предела чувствительности анализа
Отрицательный	Положительный	Положительный	Вероятная ранняя стадия инфекции, рекомендуется провести повторные исследования через три недели
Отрицательный	Положительный	Отрицательный	
Отрицательный	Отрицательный	Положительный	
Положительный	Отрицательный	Отрицательный	Образец содержит специфические антитела к белку CagA <i>H.pylori</i> , рекомендуется провести комплекс дополнительных обследований: эндоскопия, уреазный тест, бактериология.
Положительный	Положительный	Положительный или Отрицательный	

* – Исследованиями доказано, что снижение титров специфических антител класса IgG является достоверным показателем эффективности терапии и эрадикации *H.pylori*.

** – Специфические антитела класса IgA при инфицировании *H.pylori* значительно чаще обнаруживаются у больных раком и язвой желудка, чем у пациентов с хроническими гастритами.

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Кожанова М.Г. *Helicobacter pylori*: роль в развитии гастродуоденальных заболеваний и методы диагностики // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 11.- С. 52-55.
2. Кучерявый Ю.А. Инфекция *Helicobacter pylori* и заболевания поджелудочной железы // Клиническая фармакология и терапия. – 2004. – Т. 13, № 1. – С. 40-43.
3. Bermejo F., Boixeda D., Gisbert J.P. et al. Concordance between noninvasive tests in detecting *Helicobacter pylori* and potential use of serology for monitoring eradication in gastric ulcer // J Clin Gastroenterol. – 2000. – V.31 N.2 – P.137-41.
4. Holtmann G., Talley N.J., Mitchell H., Hazell S. Antibody response to specific *H. pylori* antigens in functional dyspepsia, duodenal ulcer disease, and health // Am. J. Gastroenterol. – 1998. – Vol.93 N.8 – P.1222-1227.
5. Klaamas K., Held M., Wadström T., Lipping A., Kurtenkov O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. // Int. J. Cancer. – 1996 – Vol.67, N.1 – P.1-5.
6. Kosunen T.U., Seppälä K., Saran S. Association of *Helicobacter pylori* IgA antibodies with the risk of peptic ulcer disease and gastric cancer // World J Gastroenterol. – 2005. – V.11, N.43 – P.6871-6874.
7. Kosunen T.U., Seppälä K., Sarna S., Sipponen P. // Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. – Lancet. – 1992. – V.339 N.8798 – P.893-895.
8. Me´graud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. // Clin. Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 20, No. 2. – p. 280-322.
9. Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y. et al. *Helicobacter pylori* CagA Causes Mitotic Impairment and Induces Chromosomal Instability // J. of Bio. Chem. – 2009 – No. 284 – P.22166-22172
10. WGO Practice Guideline – *Helicobacter Pylori* in developing countries. – 2005. – p.54

По вопросам, касающимся качества Набора «**Helicobacter pylori IgG-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, г. Москва, а/я 58

105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж,

тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин

Символ / Symbol	Значение символа / Symbolize
	Производитель / Manufacturer
	Дата производства / Date of manufacture
	Номер по каталогу / Catalogue number
	Номер серии / Batch code
	Использовать до (год-месяц) / Use By
	Ограничение температуры / Temperature limitation
	Только для ин витро диагностики / In Vitro Diagnostic Medical Device
	Внимание! / Caution, consult accompanying documents
	Не использовать при нарушении целостности упаковки / Do not use if package damaged
	Планшет / EIA strips
	Калибровочные пробы / Calibrator set
	Контрольная сыворотка / Control sera
	Конъюгат / Conjugate
	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) / Substrate solution
	Концентрат отмывочного раствора / Washing solution concentrate
	Стоп-реагент / Stop solution
	ИФА-Буфер / EIA buffer

Уважаемый Клиент!

Если в процессе работы с нашими Наборами Вам понадобились пластиковые ванночки для жидких реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов или дополнительные объемы реагентов (концентрат отмывочного раствора, ИФА-Буфер, раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), стоп-реагент), входящих в состав Набора, просим Вас обратиться к поставщику продукции ООО «ХЕМА» в Вашем регионе.

Все указанные расходные материалы предоставляются бесплатно, в необходимом для проведения анализа количестве.

Перечень наборов реагентов для диагностики инфекционных заболеваний производства ООО «ХЕМА»

№ по каталогу	Наименование
K101	«Toxoplasma IgG-ИФА»
K101M	«Toxoplasma IgM-ИФА»
K102	«Rubella IgG-ИФА»
K102M	«Rubella IgM-ИФА»
K103	«Cytomegalovirus IgG-ИФА»
K103M	«Cytomegalovirus IgM-ИФА»
K104	«HSV 1,2 IgG-ИФА»
K104M	«HSV 1,2 IgM-ИФА»
K105	«Chlamydia IgG-ИФА»
K106	«Mycoplasma IgG-ИФА»
K111G	«Сифилис IgG-ИФА»
K111	«Сифилис суммарные антитела-ИФА»
K121	«Aspergillus IgG-ИФА»



Russian Diagnostic
Manufacturers Association



Ассоциация российских
производителей высокоточных
диагностических реагентов



Russian Association of
Medical Laboratory
Diagnostics



Российская ассоциация
медицинских лабораторных
диагностиков

Номер горячей линии технической поддержки Клиентов:

8 800 505 23 45

Все звонки на номер горячей линии бесплатны для звонящего с любого мобильного или стационарного телефона по всей территории России.

Ждем Ваших отзывов и предложений по адресам:

Центральный офис ООО «ХЕМА»

Адрес для корреспонденции:

105043, г. Москва, а/я 58

105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж

тел.: +7 (495) 510-57 07, 737-39-36;

факс: +7 (495) 737-00-40

e-mail: info@xema.ru

www.xema-medica.com

ФООО «Хема», тел.: +7 (812) 271-24-41

191144, Санкт-Петербург, Детярный пер., д. 8-10, литер А

e-mail: spb@xema.ru

СП ООО «Хемма-Тест», тел.: (17) 211-80-39

Офис: 220029, Минск, Проспект Машерова, д. 11,

литер А, корп. 8/К, офис 416

e-mail: hemma-test@yandex.ru

ТОВ «Хема», тел.: (044) 422-62-16;

03179, г. Киев, ул. Академика Ефремова, д. 23;

e-mail: info@xema.com.ua



xemahelp



xemahelp@gmail.com





Instruction for use



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
IgM АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ
HELICOBACTER PYLORI В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ**

«Helicobacter pylori IgM-ИФА»

**A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY
FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION
OF IgM ANTIBODIES TO HELICOBACTER PYLORI
IN HUMAN SERUM OR PLASMA**

Helicobacter pylori IgM EIA

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ **REF K119M**

ТУ № 9398-1191-18619450-2012

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
№ ФСР 2012/14172 от 21 декабря 2012 г.

Антитела к ВИЧ 1,2, вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют
Контрольные сыворотки, входящие в состав набора, инактивированы.



For 96 determinations / На 96 определений



Для *in vitro* диагностики



XEMA Co., Ltd.

The 9th Parkovaya str., 48

105264 Moscow, Russia

Tel./fax: +7(495) 510-57-07

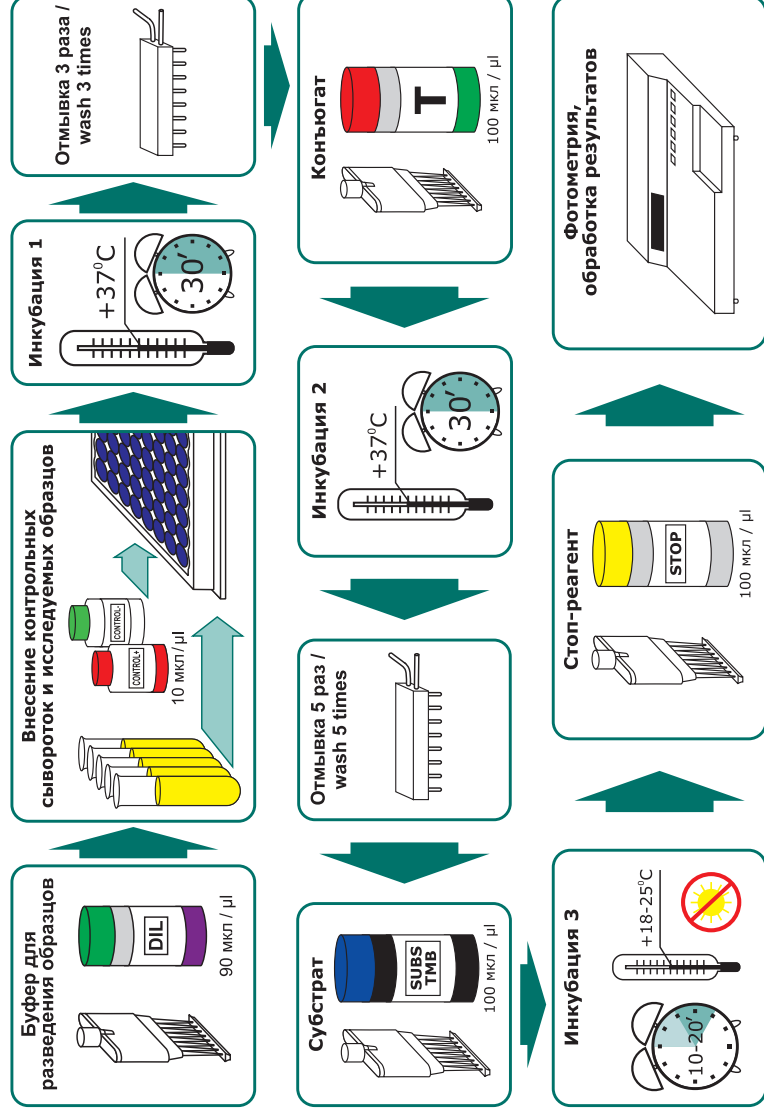
e-mail: redkin@xema-medica.com

internet: www.xema-medica.com



Authorized Representative in EU:
Polmed.de
Steinacker 20, D-73773
Aichwald, Germany
e-mail: info@polmed.de

Схема проведения анализа / Test procedure



K119M

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
4. СОСТАВ НАБОРА	5
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	6
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	6
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	7
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	8
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	9
11. ЛИТЕРАТУРА	11

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgM АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ *HELICOBACTER PYLORI* В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА» предназначен для качественного определения концентрации IgM антител к антигенам *Helicobacter pylori* в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. *H.pylori* – широко распространенный микроорганизм, которым инфицирована половина населения земного шара. Его распространенность чрезвычайно высока в развивающихся странах и достаточно низка в развитых странах мира. По данным Всемирной организации гастроэнтерологов, в странах Восточной Европы и Азии инфицированность взрослого населения составляет 70–80 %.

Исследования последних десятилетий показали ведущую роль бактерии *H. pylori* в патогенезе поражений желудка и двенадцатиперстной кишки. *H.pylori* обнаруживают почти у 100 % взрослых пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, примерно у 80 % больных язвенной болезнью желудка, у 92 % больных раком желудка и у 92 % больных с активным хроническим гастритом. Исследованиями доказано, что элиминация хеликобактера приводит к исчезновению гастрита и значительно уменьшает частоту рецидивов язвы двенадцатиперстной кишки.

1.3. Хеликобактериоз – хроническая инфекция с длительным, часто бессимптомным течением. В случае возникновения симптомы не отличаются от клинических проявлений гастродуоденита (обычно – постоянные боли в области эпигастрия). *H.pylori* очень часто присутствует у пациентов, не имеющих клинических проявлений заболевания.

1.4. Штаммы *H.pylori* чрезвычайно гетерогенны и разделяются на две большие группы – штаммы, экспрессирующие антигены VacA и CagA (тип I), и штаммы, которые не экспрессируют эти антигены (тип II). Штаммы первой группы доминируют у пациентов с язвенной болезнью и раком желудка. Белок CagA проникает в клетки эпителия слизистой оболочки, приводит к нарушению митоза и индуцирует хромосомную нестабильность. Если инфекция вызвана штаммами *H. pylori*, экспрессирующими белок CagA, в организме человека вырабатываются антитела специфичные к этому антигену. Антитела к белкам CagA выявляются у 80–100 % пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и у 94 % больных раком желудка. Поэтому выявление антител, специфичных к белку CagA, является информативным маркером в диагностике язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и рака желудка.

1.5. Штаммы *H.pylori* II типа, которые не экспрессируют антигены CagA и VacA, не ассоциируются с тяжелыми поражениями желудка и двенадцатиперстной кишки, в частности, язвенной болезнью и раком.

1.6. Инфекция *H.pylori* может быть обнаружена как инвазивными, так и неинвазивными диагностическими методами. Инвазивные методы включают исследование биоптатов слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта гистологическими, культуральными методами или быстрым уреазным тестом, однако, неоднородное распространение *H.pylori* по слизистой часто приводит к ложноотрицательным результатам. К неинвазивным методам диагностики относятся серологические исследования сыворотки пациента на наличие специфических к *H.pylori* антител и дыхательный уреазный тест с применением радиоактивно меченой мочевины. Иммуоферментный анализ на выявление специфических антител классов IgG/IgA/IgM является минимально инвазивным, быстрым, высокочувствительным и информативным методом диагностики инфекции *H.pylori*.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgM антител к антигенам *Helicobacter pylori* основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуоферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован рекомбинантный белок CagA *H.pylori*. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата – мышиных моноклональных антител к IgM человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgM антител к антигенам *Helicobacter pylori*. Индекс позитивности (ИП, %) IgM антител к антигенам *Helicobacter pylori* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность и специфичность.

Чувствительность Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА» оценивали с помощью панели охарактеризованных сывороток, которая состоит из 42 образцов сывороток крови человека, содержащих антитела класса IgM к *H. pylori*. В Наборе реагентов «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА» все сыворотки были определены как положительные. При исследовании 158 отрицательных на антитела к *H. pylori* сывороток показатель специфичности составил более 98%.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgM антител к антигенам *Helicobacter pylori* в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА» не превышает 8.0%.

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА» (Intra-assay).

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %	CV2, %
1	32	3.7	2.6	2.7
2	32	8.9	4.3	5.1

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %
1	8	3.2	3.9
2	8	8.7	6.1

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P119Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN119MZ CP119MZ	CONTROL - CONTROL+	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроль) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgM антител к антигенам Helicobacter pylori, готовы к использованию (0,5 мл и 0,2 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T119MZ	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость зеленого цвета
4	SP119MZ	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
9	K119MI	-	Инструкция по применению Набора реагентов «Helicobacter pylori IgM-ИФА»	1	шт	-
10	K119MQ	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Helicobacter pylori IgM-ИФА»	1	шт	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «*Helicobacter pylori* IgM-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- Буфер для разведения образцов, конъюгат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.7. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка).
2	Внесите во все лунки планшета по 90 мкл ИФА-Буфера.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение контрольных сывороток и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
4	ВНИМАНИЕ! При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензида. Внесение раствора субстрата тетраметилбензида в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

13 Рассчитайте содержание антител к антигенам в исследуемых образцах. Для этого:

1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:

$$\text{ОП (CN119MZ)}_{\text{Ср}} = (\text{ОП1 (CN119MZ)} + \text{ОП2 (CN119MZ)} + \text{ОП3 (CN119MZ)}) / 3;$$

Результаты анализа считать достоверными, если:

- ОП **Положительного контроля** не ниже **0.6 оптических единиц** (ОЕ);
- ОП **Отрицательного контроля** не выше **0.15 ОЕ** во всех лунках.

2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.25

$$\text{Cut off} = \text{ОП (CN119MZ)}_{\text{Ср}} + 0.25$$

3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off

$$\text{ИП} = \text{ОП образца} / \text{Cut off}$$

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

При $\text{ИП} > 1.1$ образец положительный,
при $\text{ИП} < 0.9$ – отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-). Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными. При интерпретации результатов исследований детских сывороток уровень граничного значения должен быть пониженным на 10%.

Результат исследования детских сывороток		Результат исследования сывороток взрослых	
ИП образца > 0.9	положительный	ИП образца > 1.1	положительный
$0.8 \leq \text{ИП образца} \leq 0.9$	неопределенный	$0.9 \leq \text{ИП образца} \leq 1.1$	неопределенный
ИП образца < 0.8	отрицательный	ИП образца < 0.9	отрицательный

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в парных сыворотках крови. ИП в пределах 1.1–7.0 пропорционален содержанию специфических антител класса IgG. Это позволяет проводить исследование парных сывороток полученных от пациентов с интервалом в 2–4 недели.

Если ИП образца составляет выше 7.0 для корректной оценки относительно содержания специфических антител, рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разведенного раствором для разведения сывороток в 10 раз, при определении индекса позитивности в таком случае следует умножить полученное значение ИП на 10. Такой способ интерпретации результатов анализа позволяет сравнивать уровень специфических антител к *H. pylori* в динамике.

Интерпретация результатов определения антител классов IgG, IgA и IgM специфичных к белку CagA *H.pylori*

Результат определения антител к белку CagA <i>H.pylori</i>			Интерпретация результата
IgG*	IgA**	IgM	
Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Образец не содержит специфических антител к CagA <i>H.pylori</i> , либо их концентрация ниже предела чувствительности анализа
Отрицательный	Положительный	Положительный	Вероятная ранняя стадия инфекции, рекомендуется провести повторные исследования через три недели
Отрицательный	Положительный	Отрицательный	
Отрицательный	Отрицательный	Положительный	
Положительный	Отрицательный	Отрицательный	Образец содержит специфические антитела к белку CagA <i>H.pylori</i> , рекомендуется провести комплекс дополнительных обследований: эндоскопия, уреазный тест, бактериология.
Положительный	Положительный	Положительный или Отрицательный	

* – Исследованиями доказано, что снижение титров специфических антител класса IgG является достоверным показателем эффективности терапии и эрадикации *H.pylori*.

** – Специфические антитела класса IgA при инфицировании *H.pylori* значительно чаще обнаруживаются у больных раком и язвой желудка, чем у пациентов с хроническими гастритами.

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Кожанова М.Г. *Helicobacter pylori*: роль в развитии гастродуоденальных заболеваний и методы диагностики // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 11. – С. 52-55.
2. Кучерявый Ю.А. Инфекция *Helicobacter pylori* и заболевания поджелудочной железы // Клиническая фармакология и терапия. – 2004. – Т. 13, № 1. – С. 40-43.
3. Bermejo F., Boixeda D., Gisbert J.P. et al. Concordance between noninvasive tests in detecting *Helicobacter pylori* and potential use of serology for monitoring eradication in gastric ulcer // J Clin Gastroenterol. – 2000. – V.31 N.2 – P.137-41.
4. Holtmann G., Talley N.J., Mitchell H., Hazell S. Antibody response to specific *H. pylori* antigens in functional dyspepsia, duodenal ulcer disease, and health // Am. J. Gastroenterol. – 1998. – Vol.93 N.8 – P.1222-1227.
5. Klammas K., Held M., Wadström T., Lipping A., Kurtenkov O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. // Int. J. Cancer. – 1996 – Vol.67, N.1 – P.1-5.
6. Kosunen T.U., Seppälä K., Saran S. Association of *Helicobacter pylori* IgA antibodies with the risk of peptic ulcer disease and gastric cancer // World J Gastroenterol. – 2005. – V.11, N.43 – P.6871-6874.
7. Kosunen T.U., Seppälä K., Sarna S., Sipponen P. // Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. – Lancet. – 1992. – V.339 N.8798 – P.893-895.
8. Me'graud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. // Clin. Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 20, No. 2. – p. 280-322.
9. Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y. et al. *Helicobacter pylori* CagA Causes Mitotic Impairment and Induces Chromosomal Instability // J. of Bio. Chem. – 2009 – No. 284 – P.22166-22172
10. WGO Practice Guideline – *Helicobacter Pylori* in developing countries. – 2005. – p.54

По вопросам, касающимся качества Набора «**Helicobacter pylori IgM-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105043, г. Москва, а/я 58

105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж,
тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА», к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM ANTIBODIES TO *HELICOBACTER PYLORI* IN HUMAN SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM antibodies to *Helicobacter pylori* in serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 46 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

H. pylori is detectable in nearly 100% of adult patients with duodenal ulcer, about 80% of patients with gastric ulcer, more than 90% of gastric cancer patients and more than 90% of patients with active chronic gastritis. An association between *H. pylori* and gastric cancer is confirmed. In developing countries, where prevalence of *H. pylori* infection is high (ca. 70-80% of population for Eastern Europe and Asia), most children become infected by the age of 10, and gastric cancer rates are very high. In the USA and other developed countries, standards of hygiene and the increasing socioeconomic status of the population have reduced the incidence of infection, and in parallel, the rates of peptic ulcers and gastric cancer have declined. There is an excellent correlation between the clinical presentation of gastritis, the presence of *H. pylori* in the stomach and elevated serum *H. pylori* IgG antibody. Moreover, eradication of *H. pylori* from a patient leads to a recovery from gastritis and a significant reduction in duodenal ulcer recurrence. *H. pylori*-specific IgG antibody also falls significantly after successful antibacterial therapy. *H. pylori* strains are classified into two broad groups - those that express both VacA (vacuolising toxin) and CagA (cytotoxin-associated gene) (type I) and those that produce neither (type II). Type I strains are predominate in patients with ulcers and cancer, while type II strains are mostly associated with asymptomatic infections. 80-100% of patients with duodenal ulcer disease produce CagA antibodies against a 128 kd antigen compared with 60-63% of *H. pylori*-infected persons with gastritis only, indicating that serologic responses to the 128 kd protein are more prevalent among *H. pylori*-infected persons with duodenal ulcers than infected persons without peptic ulceration. In *H. pylori*-infected patients who develop gastric cancer or duodenal ulcer, serum IgG against CagA are found in 94% and 80-100% of patients, resp., thus indicating that detection of antibodies to CagA is a useful marker for diagnosis of gastric cancer and duodenal ulcer. For gastritis, prevalence of IgG-antibodies to *H. pylori* is lower – ca. 60-63%.

The IgM test detects antibodies formed 2-4 weeks after infection with *H. pylori*. IgG and IgA antibodies require up to two months after infection before becoming detectable. If the immune system fails to eradicate the bacterium, it will begin to colonise the mucosal lining of the upper gastrointestinal tract. In the absence of *H. pylori* IgG, IgM positivity should be considered as a reason for treatment only in case of existing active symptoms of gastric ulcer. If treatment is not chosen in the presence of *H. pylori* IgM antibodies, it is advisable to carry out IgG testing after 2-3 months to confirm infection eradication by the immune system.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on indirect enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated with CagA protein of *Helicobacter pylori*. Antibodies from the specimen bind coated CagA protein of *Helicobacter pylori* on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies directed towards species specific IgG, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Positivity index (PI, %) is calculated by the formula (see Calculations). Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- 4.1.** For professional use only.
- 4.2.** This kit is intended for in vitro diagnostic use only.
- 4.3. INFECTION HAZARD:** There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.
- 4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5.0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- 4.5.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.
- 4.6.** Do not use the kit beyond the expiration date.
- 4.7.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are obtained only when using calibrated pipettes and microplate readers.
- 4.8.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- 4.9.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.
- 4.10.** Do not mix reagents from different lots.
- 4.11.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.
- 4.12.** Do not pipette reagents by mouth.
- 4.13.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.
- 4.14.** Material Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.
- 4.15.** The Material Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5. KIT COMPONENTS

5.1. Contents of the Kit

	Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP	<i>Helicobacter pylori</i> IgM EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2	CONTROL - CONTROL +	Control sera (0.5 ml and 0.2 ml, resp.)	2	pcs	colourless; red	2 months
3	CONJ HRP	Conjugate, 14 ml	1	pcs	green	until exp. date
4	DIL	EIA Sample buffer 14 ml	1	pcs	purple	until exp. date
5	SUBS TMB	Substrate solution, 14 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
6	BUF WASH 26X	Washing solution concentrate 26x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp. date
7	STOP	Stop solution, 14 ml	1	pcs	Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or 5 days at RT	until exp. date
8	N003	Plate sealing tape	2	pcs	colourless	until exp. date
9	K119MI	Instruction <i>Helicobacter pylori</i> IgM EIA	1	pcs	-	N/A
10	K119MQ	QC data sheet <i>Helicobacter pylori</i> IgM EIA	1	pcs	-	N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 90-250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 10-250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±2 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0-3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE.

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at 2-8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18 to +25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the vials with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 26X by 26 dilution in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Alternative units:

7.5. Assay procedure:

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 4 wells for control samples CONTROL - CONTROL + (3 and 1 wells resp.) and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pipet 90 µl of EIA Sample buffer into each well.
3	Pipet 10 µl of control samples CONTROL - CONTROL + and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 30 minutes at 37 °C.
5	Prepare washing solution by 26x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 26X with distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times.
6	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
7	Incubate 30 minutes at 37 °C.
8	Wash the strips 5 times.
9	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells.
10	Incubate 10-20 minutes at 18-25 °C.
11	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
12	Measure OD (optical density) at 450 nm.
13	Set photometer blank on air.

For the assay to be valid, the following requirements should be met:

1. OD450 for CONTROL+ should be nlt 0.6 AU.
2. OD450 for CONTROL- should not be more than 0.15 AU for all replicates.

8. EXPECTED VALUES

CALCULATION OF RESULTS.

1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for CONTROL- in triplicates and each pair of samples.
2. Calculate the cut-off value: (mean OD450 for CONTROL-) + 0.25
3. Calculate Positivity Index (PI) for each sample:

$$PI = \text{mean OD450}(\text{sample}) / \text{Cut-off}$$

If PI value is greater than 1.1, the result is POSITIVE.

If PI value is less than 0.9, the result is NEGATIVE.

If PI value is between 0.9 and 1.1, the result is EQUIVOCAL. Such samples should be retested. If the result is equivocal again, a new sample should be obtained 2-4 weeks later and tested again. If the result remains equivocal, the sample should be considered negative. Therapeutic consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutic measures. NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Analytical specificity.

Specificity of the test was evaluated on 93 negative serum specimens. Based on these data, specificity of the test is 98%.

11.2 Analytical sensitivity.

Specificity of kit was evaluated using internal panel "H.Pylori Positive Control".

11.3 Precision.

Intra-assay precision for two different lots (CV1, CV2) is shown below:

Serum, no	Replicates	Value, IP overage	CV1, %	CV2, %
1	32	3.4	2.9	2.8
2	32	9.1	4.8	5

Inter-assay precision is shown below:

Serum, no	Duplicated	Value, IP overage	CV, %
1	8	3.1	3.9
2	8	9	6.2

Символ / Symbol	Значение символа / Symbolize
	Производитель / Manufacturer
	Дата производства / Date of manufacture
REF	Номер по каталогу / Catalogue number
LOT	Номер серии / Batch code
 YYYY-MM	Использовать до (год-месяц) / Use By
	Ограничение температуры / Temperature limitation
IVD	Только для ин витро диагностики / In Vitro Diagnostic Medical Device
	Внимание! / Caution, consult accompanying documents
	Не использовать при нарушении целостности упаковки / Do not use if package damaged
SORB MTP	Планшет / EIA strips
CAL	Калибровочные пробы / Calibrator set
CONTROL	Контрольная сыворотка / Control sera
CONJ HRP	Конъюгат / Conjugate
SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) / Substrate solution
BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора / Washing solution concentrate
STOP	Стоп-реагент / Stop solution
DIL	ИФА-Буфер / EIA buffer

Уважаемый Клиент!

Если в процессе работы с нашими Наборами Вам понадобились пластиковые ванночки для жидких реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов или дополнительные объемы реагентов (концентрат отмывочного раствора, ИФА-Буфер, раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), стоп-реагент), входящих в состав Набора, просим Вас обратиться к поставщику продукции ООО «ХЕМА» в Вашем регионе.

Все указанные расходные материалы предоставляются бесплатно, в необходимом для проведения анализа количестве.

Перечень наборов реагентов для диагностики инфекционных заболеваний производства ООО «ХЕМА»

№ по каталогу	Наименование
K101	«Toxoplasma IgG-ИФА»
K101M	«Toxoplasma IgM-ИФА»
K102	«Rubella IgG-ИФА»
K102M	«Rubella IgM-ИФА»
K103	«Cytomegalovirus IgG-ИФА»
K103M	«Cytomegalovirus IgM-ИФА»
K104	«HSV 1,2 IgG-ИФА»
K104M	«HSV 1,2 IgM-ИФА»
K105	«Chlamydia IgG-ИФА»
K106	«Mycoplasma IgG-ИФА»
K111G	«Сифилис IgG-ИФА»
K111	«Сифилис суммарные антитела-ИФА»
K121	«Aspergillus IgG-ИФА»



Russian Diagnostic Manufacturers Association



Ассоциация российских производителей средств лабораторной диагностики



RUSSIAN ASSOCIATION OF MEDICAL LABORATORY DIAGNOSTICS



РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ДИАГНОСТИКОВ

Номер горячей линии технической поддержки Клиентов:

8 800 505 23 45

Все звонки на номер горячей линии бесплатны для звонящего с любого мобильного или стационарного телефона по всей территории России.

Ждем Ваших отзывов и предложений по адресам:

Центральный офис ООО «ХЕМА»

Адрес для корреспонденции:

105043, г. Москва, а/я 58

105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж

тел.: +7 (495) 510-57 07, 737-39-36;

факс: +7 (495) 737-00-40

e-mail: info@xema.ru

www.xema-medica.com

ФООО «Хема», тел.: +7 (812) 271-24-41

191144, Санкт-Петербург, Дегтярный пер., д. 8-10, литер А

e-mail: spb@xema.ru

СП ООО «Хемма-Тест», тел.: (17) 211-80-39

Офис: 220029, Минск, Проспект Машерова, д. 11,

литер А, корп. 8/К, офис 416

e-mail: hemma-test@yandex.ru

ТОВ «Хема», тел.: (044) 422-62-16;

03179, г. Киев, ул. Академика Ефремова, д. 23;

e-mail: info@xema.com.ua



xemahelp



xemahelp@gmail.com





Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the quantitative determination of
total IgE in human serum or plasma

Total IgE EIA

Catalogue number **REF K200**



For 96 determinations



In vitro diagnostic medical device

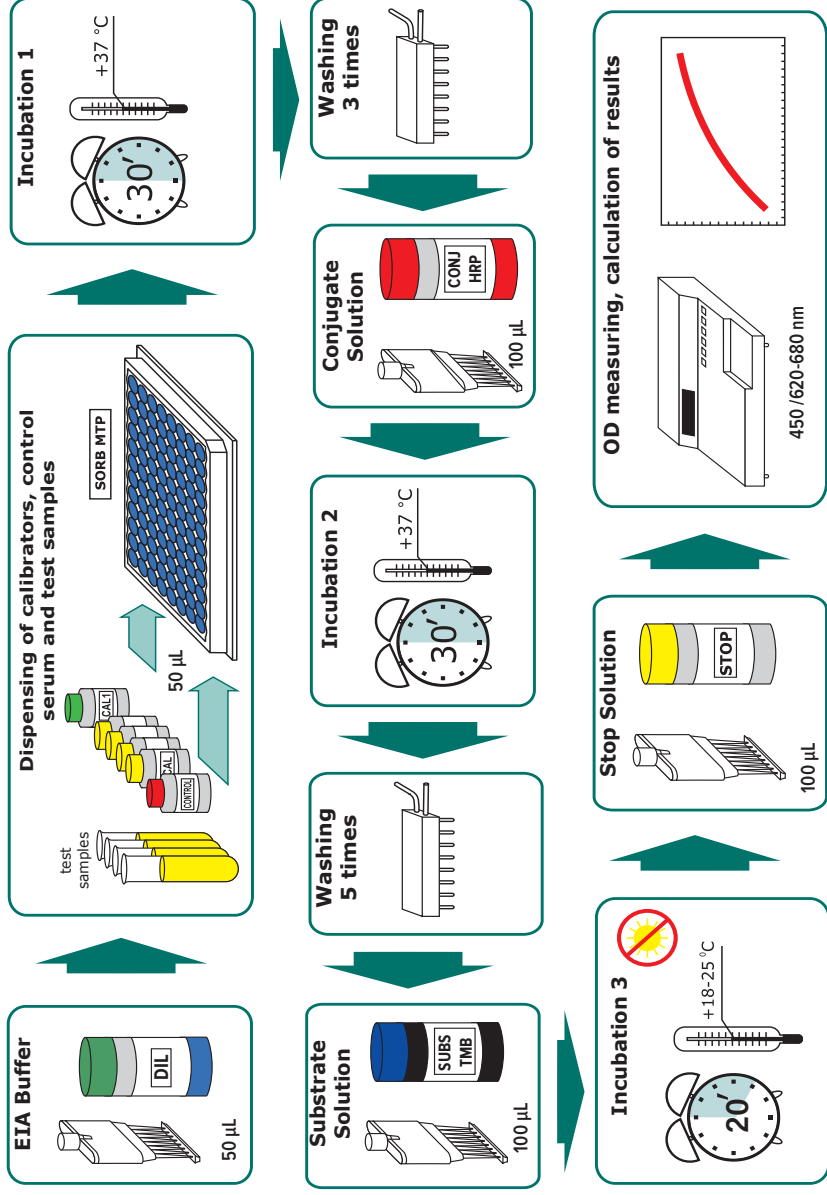


XEMA LLC
Akademika Yefremova St. 23
03179, Kyiv, Ukraine
tel.: +38 044 422-62-16
tel.: +38 044 294-69-78
E-mail: qa@xema.com.ua
www.xema.com.ua



Authorized Representative in EU:
Polmed.de Beata Rozwadowska
Fichtenstr. 12A, 90763 Fuerth, Germany
tel.: +49 911 931 639 67
E-mail: info@polmed.de
www.polmed.de

ASSAY PROCEDURE



CONTENT

1. INTENDED USE	2
2. GENERAL INFORMATION	2
3. TEST PRINCIPLE	2
4. KIT COMPONENTS	3
5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED	4
6. WARNING AND PRECAUTIONS	4
7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES	5
8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL	5
9. REAGENTS PREPARATION	6
10. ASSAY PROCEDURE	7
11. TEST VALIDITY	8
12. EXPECTED VALUES	8
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
14. REFERENCES	10
SAMPLES IDENTIFICATION PLAN	11

Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the quantitative determination of
total IgE in human serum or plasma
Total IgE EIA

1. INTENDED USE

The Total IgE EIA kit is an enzyme immunoassay, intended for the quantitative determination of total IgE concentration in human serum or plasma.

The field of application is clinical laboratory diagnostics.

2. GENERAL INFORMATION

Total immunoglobulin E (IgE) serum level is widely reported as the laboratory marker of atopic diseases such as atopic asthma, atopic dermatitis, and pollenosis. An atopic (IgE-dependent) mechanism can also underlie gastroenterocolitis, urticaria, other forms of vasculitis (including systemic), cholecystitis, vulvovaginitis, and cystitis. Part of the drug allergy (mainly to penicillin and protein drugs) also develops according to the IgE-dependent mechanism. In all of the conditions listed above, the production of high titers of specific IgE antibodies can lead to an increase in the level of total IgE in the serum. A particularly high level of total IgE is characteristic of atopic dermatitis. In addition to atopic diseases, total serum IgE is significantly increased in parasitic infestations and mycoses (especially systemic), rarely in systemic autoimmune diseases and immunodeficiency states (especially in hyper-IgE syndrome), as well as in mastocytosis (mast cell tumor) and extremely rare IgE-myeloma. A decrease in the level of total IgE in serum (below 15 IU/ml in adults) is a rare and little-studied phenomenon described in hypogammaglobulinemia, some autoimmune diseases, ulcerative colitis, and primary biliary cirrhosis.

3. TEST PRINCIPLE

The determination of the total IgE is based on the two-site sandwich enzyme immunoassay principle. On the inner surface of the microplate wells are immobilized specific murine monoclonal antibodies to human IgE. Second antibodies – rabbit polyclonal antibodies to IgE conjugated to the horseradish peroxidase is used as enzyme conjugate. The analysis procedure includes three stages of incubation:

- during the first stage the total IgE from the specimen is captured by the monoclonal antibodies coated onto the microwell surface;
- during the second stage horseradish peroxidase-conjugated with rabbit polyclonal antibodies bind to free epitopes of immobilized total IgE, fixed in the formed at the previous stage complexes;
- during the third stage, the complexes formed due to the reaction with the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine are visualized.

After stopping the reaction with a stop solution, the intensity of the color of the microwells is measured. The optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured total IgE in the serum specimen (plasma).

The concentration is determined according to the calibration graph of the dependence of the optical density on the content of total IgE in the calibration samples.

4. KIT COMPONENTS

Code of component	Symbol	Name	Volume	Qty, pcs.	Description
P200Z	SORB MTP	Microplate	-	1	96-well polystyrene strip microplate coated with murine monoclonal antibodies to total IgE; ready to use
C200Z	CAL 1	Calibrator C1	0.8 mL	1	Solution based on phosphate buffer, free of total IgE, with preservative, ready to use (yellow liquid)
C200Z	CAL 1-5	Calibrators	0.8 mL	5	Solutions based on phosphate buffer, containing 50; 200; 500 and 1000 IU/mL of total IgE, ready to use (red liquids)
Q200Z	CONTROL	Control serum	0.8 mL	1	Solution based on human serum, containing of known total IgE content, with preservative, ready to use (colourless liquid)
T200Z	CONJ HRP	Conjugate Solution	14 mL	1	Solution of rabbit polyclonal antibodies to human total IgE conjugated to the horseradish peroxidase; ready to use (red liquid)
S011Z	DIL	EIA Buffer	14 mL	1	Buffer solution with detergent and preservative, ready to use (blue liquid)
R055Z	SUBS TMB	Substrate Solution	14 mL	1	Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution; ready to use (colourless liquid)
S008Z	BUF WASH 26X	26x Concentrate Washing Solution	30 mL	1	Buffer solution with detergent, 26x concentrate (colourless liquid)
R050Z	STOP	Stop Solution	14 mL	1	5.0% solution of sulphuric acid; ready to use (colourless liquid)
The kit also includes instruction for use, quality control data sheet and plate sealing tape (3 pcs.)					

5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- microplate photometer with 450 nm wavelength or 450\620-680 nm;
- dry thermostat for 37 °C±2 °C;
- automatic plate washer (optional);
- micropipettes with variable volume, range volume 5-1000 µL;
- graduated cylinder of 1000 mL capacity;
- distilled or deionized water;
- timer;
- vortex mixer;
- disposable gloves;
- absorbent paper.

6. WARNING AND PRECAUTIONS

In order to prevent incorrect results, strictly follow the recommended order and duration of the analysis procedure.

6.1. The kit is for *in vitro* diagnostic use only. For professional laboratory use.

6.2. Follow the rules mentioned below during the kit using:

- do not use kit beyond expire date;
- do not use the kit if its packaging is damaged;
- in order to avoid contamination, use new tips to pipette samples and reagents;
- use only verified equipment;
- close each vial with its own cap, after using the reagent;
- do not use components of other kits or reagents of other manufacturers;
- do not let wells dry after completing the rinsing step; immediately proceed to the next stage;
- avoid bubbles when adding reagents.

ATTENTION! The TMB substrate solution is light sensitive. Avoid prolonged exposure of the component to light.

6.3. Some kit components, such as stop solution, substrate solution, and washing solution, may cause toxic or irritant effects. If they get on the skin or mucosa, the affected area should be washed with plenty of running water.

6.4. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

6.5. The Calibrators and Control Serum included in the kit are negative for antibodies to HIV 1,2, hepatitis C virus and HBsAg, but the reagents should be considered as potentially infectious material and handled carefully.

6.6. Specimens must not contain any azide compounds, as they inhibit activity of peroxidase.

6.7. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection.

6.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

6.9. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA LLC.

6.10. Serious incidents related to the kit must be reported to the manufacturer, Authorized Representative, and to the Competent Authority of the EU member state(s) where the incident has occurred.

7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES

7.1. Blood sampling should be carried out from the cubital vein with a disposable needle using a vacuum blood sampling system. Serum or plasma specimens should be clearly labeled and identified. Serum must be separated from the clot as early as possible to avoid hemolysis of red blood cells. If there are any visible particles in the sample, they should be removed by centrifugation at 3000-5000 rpm for 20 minutes at room temperature or by filtration.

Don't use samples with high lipidemia, hemolysis as they may give false test results.

7.2. Specimen should be stored at +2...+8°C up to 3 days. Specimen held for a longer time, should be placed in a freezer at -15°C or below; do not refreeze/thaw samples.

7.3. For the transportation of samples, it is recommended to use triple packaging. The primary package is the labeled tube containing the sample. Secondary packaging is a polyethylene bag that is hermetically closed with a zip-lock. The outer packaging is a heat-insulating container, while the secondary packaging is placed in the outer packaging for transportation in the center of the thermal container. Frozen refrigerants are placed on the bottom, along the side walls of the thermal container, and cover the samples with them.

8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL

Information about the singularity storage conditions, transportation of the kit, and disposal of waste should be taken into account by all persons who participate in these processes.

8.1. Transportation

The Total IgE EIA kit should be transported in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Single transportation at the temperature up to 25°C for 5 days is acceptable.

8.2. Storage

The Total IgE EIA kit should be stored in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Do not freeze.

The kit contains reagents sufficient for 96 determinations including Calibrators and Control Serum.

Once opened test-kit is stable for 2 months when stored properly as intended by manufacturer at 2-8°C.

In case of partial use of the kit, the components should be stored in the following way:

- strips that remain unused must be carefully sealed with the plate sealing tape and stored at +2...+8°C within 2 months;
- EIA Buffer, Substrate Solution, Stop Solution, and Washing Solution concentrate after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C until the kit's shelf life;
- Conjugate Solution, Calibrators and Control Serum after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C within 2 months;
- diluted Washing Solution can be stored at room temperature (+18...+25°C) for up to 5 days or at +2...+8°C for up to 14 days.

Kits that were stored in violation of the storage condition cannot be used.

8.3. Disposal

Expired kit components, used reagents and materials, as well as residual samples must be inactivated and disposed of in accordance with legal requirements.

9. REAGENTS PREPARATION

9.1. All reagents (including microstrips) and test samples should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before use.

9.2. Microplate preparation

Open the package with the microplate and install the required number of strips into the frame. Unused strips must be sealed with plate sealing tape to prevent moisture from affecting the plate's holes and placed back in the bag.

9.3. Washing solution preparation

Add the contents of the 30 mL washing solution concentrate vial to 750 mL of distilled or deionized water and mix thoroughly. In case of partial use of the kit, take the necessary amount of washing solution concentrate and dilute it 26 times with distilled or deionized water.

The spending of the components in case of partial use of the kit is given in the table:

Quantity of strips	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volume of the washing solution concentrate, mL	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	27.5	30
Volume of water, mL	62.5	125	187.5	250	312.5	375	437.5	500	562.5	625	687.5	750

10. ASSAY PROCEDURE

10.1 Put the desired number of strips into the frame based on the number of test samples in 2 replicates and 12 wells for Calibrators and Control Serum (2 wells for each Calibrator (CAL 1-5) and 2 wells for Control Serum (Q)).

10.2 Dispense **50 µL of EIA Buffer** to all wells.

10.3 Dispense **50 µL of Calibrators and Control Serum as well as 50 µL of test serum/plasma samples (SAMP)** to the wells of the microplate according to the scheme below. The introduction of Calibrators, Control Serum and test samples should be carried out within 5 minutes to ensure equal incubation time for the first and last samples.

NOTE: during performing several independent series of tests, Calibrators, and Control Serum should be used each time.

Scheme of introduction of samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL1	SAMP3	SAMP3	SAMP11	SAMP11						
B	CAL2	CAL2	SAMP4	SAMP4	SAMP12	SAMP12						
C	CAL3	CAL3	SAMP5	SAMP5	SAMP13	SAMP13						
D	CAL4	CAL4	SAMP6	SAMP6	SAMP14	SAMP14						
E	CAL5	CAL5	SAMP7	SAMP7	SAMP15	SAMP15						
F	Q	Q	SAMP8	SAMP8								
G	SAMP1	SAMP1	SAMP9	SAMP9								
H	SAMP2	SAMP2	SAMP10	SAMP10								

- 10.4 Carefully mix the contents of the microplate in a circular motion on a horizontal surface, cover strips with a plate sealing tape and incubate for **30 minutes at +37 °C**.
- 10.5 At the end of the incubation period, remove and discard the plate cover. Aspirate and wash each well 3 times using an automatic washer or an 8-channel dispenser. For each washing, add 300 µL of Washing Solution (see 9.3) to all wells, then remove the liquid by aspiration or decantation. The residual volume of the Washing Solution after each aspiration or decantation should be no more than 5µL. After washing, carefully remove the remaining liquid from the wells on the absorbent paper. For the automatic washer/analyzer, the Washing Solution volume can be increased to 350 µL.
- 10.6 Add **100 µL of Conjugate Solution** to all wells.
- 10.7 Cover strips with a plate sealing tape and incubate for **30 minutes at +37 °C**.
- 10.8 At the end of the incubation period, aspirate and wash each well 5 times as described in 10.5.
- 10.9 Add **100 µL of Substrate Solution** to all wells. The introduction of the Substrate Solution into the wells must be carried out within 2-3 minutes. Incubate the microplate in the dark **at room temperature (+18...+25°C) for 20 minutes**.
- 10.10 Add **100 µL of Stop Solution** to all wells in the same order as the Substrate Solution. After adding the Stop Solution, the contents of the wells turn yellow.
- 10.11 Read the optical density (OD) of the wells at 450nm and reference light filters 620–680 nm using a microplate photometer within 5 minutes of adding the stop solution. Set photometer blank on CAL1.
- 10.12 Plot a calibration curve in linear coordinates: (x) is the concentration of total IgE in the Calibrators IU/mL, (y) – OD versus concentration of total IgE (OD 450 nm / 620–680 nm). Manual or computerized data reduction is applicable at this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.
- 10.13 Determine the corresponding concentration of total IgE in tested samples from the calibration curve.

11. TEST VALIDITY

The test run shall be considered valid if the OD of CAL1 is above 0.15, and the values of the Control Serum fall into the required range (see Quality control Data Sheet).

12. EXPECTED VALUES

12.1. Therapeutical consequences should not be based on the results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for total IgE. Based on data obtained by XEMA LLC, the following normal range is recommended (see below).

NOTE: values of total IgE concentrations in the tested samples that are below the LoD (3 IU/mL) and also exceed the value of the upper calibrator (1000 IU/mL) should be provided in the following form : «the total IgE concentration of tested sample X is «lower than 3 IU/mL» or «higher than 1000 IU/mL».

12.2. The calibrators concentration values of the Total IgE EIA kit are expressed in IU/mL. To calculate concentrations in ng/mL, the received concentration value in IU/mL shall be multiplied by 2.4.

$$1 \text{ IU/mL} = 2.4 \text{ ng/mL.}$$

Sex, age	Units, IU/mL		Units alternative, ng/mL	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
< 6 months	-	12	-	28.8
6-12 months	-	30	-	72.0
1-3 yrs	-	45	-	108.0
4-6 yrs	-	70	-	168.0
7-9 yrs	-	90	-	216.0
10-15 yrs	-	120	-	288.0
>15 yrs	-	130	-	312.0

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1. Analytical performance characteristics

13.1.1 Precision of Measurement

Repeatability (Intra assay repeatability) was determined by evaluation the coefficient of variation (CV) for 2 different samples during 1 day in 24 replicates on one series of ELISA kit.

Sample	Concentration, IU/mL	CV, %
1	10.6	4.33
2	116.2	5.47

Reproducibility (Inter assay reproducibility) was determined by evaluating the coefficients of variation for 2 samples during 5 days in 8-replicate determinations.

Sample	Concentration, IU/mL	CV, %
1	12.5	8.36
2	113.4	1.47

Reproducibility between lots was investigated by testing samples for one day on three lots. Each sample was run in 8 replicates.

Sample	Concentration1, IU/mL	Concentration2, IU/mL	Concentration3, IU/mL	CV, %
1	12.7	13.3	12.3	3.66
2	115.5	117.8	115.1	1.25

13.1.2 Trueness

The trueness of measurement is the degree of closeness of the average value obtained from a large number of measurement results to the true value. The bias of the measurement result (bias of measurements) is the difference between the mathematical expectation of the measurement result and the true value of the measurand. The bias was calculated for each sample and it was determined that it corresponds to the specified limits of $\pm 10\%$.

13.1.3 Linearity

Linearity was determined using sera samples with known total IgE concentration (low and high) and mixing them with each other and buffer solution in different proportions. According to the measurements, linear range of kit is 50-1000 IU/mL $\pm 10\%$.

13.1.4 Analytical sensitivity

Limit of detection (LoD) – the lowest total IgE concentration in the serum or plasma sample that is detected by the Total IgE EIA kit is no lower than 3 IU/mL.

Limit of quantification (LoQ) – the lowest concentration of the analyte in the sample that is determined quantitatively with the declared trueness for Total IgE EIA kit is 50IU/mL.

13.1.5 Analytical specificity

For the analysis result is not affected by the presence in the sample of bilirubin in a concentration of up to 0.21 mg/mL and hemoglobin in a concentration of up to 10 mg/mL.

The cross-reactivity of total IgE with other analytes is shown in the table:

Analyte	Concentration, IU/mL	Cross-reactivity, %
IgA	1000	Not detected
IgM	1000	Not detected
IgG	1000	Not detected

14. REFERENCES

1. Zetterstrom and Hohansson S.G.O. Allergy 1981; 36:537.
2. Buckley R. H. Immunopharmacology of Allergic Disease 1979; 117.
3. Michel f. B., Bousquet J. and Greillier P. J. Allergy Clin. Immunol. 1980; 64:422.
4. Ishizaka T. Ann Allergy 1982; 48: 313.
5. Kulczycki A. Jr. J. Allergy Clin. Immunol. 1981; 68:5.
6. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
7. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
8. НПАОП 85.14-1.09-81. Правила облаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарноепідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров`я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81)

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____ DATE _____

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____ DATE _____

	Manufacturer
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Catalogue number
	Use-by date
	Batch code
	Temperature limit
	Contains sufficient for <n> tests
	Caution
	Consult instructions for use
	Conformity Marking with technical regulations in Ukraine
	Authorized representative in the European Community/European Union
	CE Conformity Marking

**For any issues related to operation of the kit and technical support,
please contact by telefon number**

+38 044 294-69-78

or write to:

qa@xema.com.ua



XEMA LLC

Akademika Yefremova St. 23

03179, Kyiv, Ukraine

tel.:+38 044 422-62-16

tel.:+38 044 294-69-78

E-mail: qa@xema.com.ua

www.xema.in.ua